

Patent (No,Kind,Date): JP 8506322 T2 19960709  
Priority (No,Kind,Date): WO 93US10868 W 19931109; US 974750 A  
19921110; US 96739 A 19930723  
Applic (No,Kind,Date): JP 93512329 A 19931109  
IPC: \* A61K-031/70; C07H-005/06; C07H-011/00  
CA Abstract No: \* 121(10)117701N  
Derwent WPI Acc No: \* C 94-183144  
Language of Document: Japanese

B2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

varying dosages of the substance of 0-2 microg/gm mouse, and a carrier.

USE - The compsns. and methods can be used to delay or prevent allograft rejection and to prevent variety of pathological processes such as those related to auto-immune diseases, allergy, inflammatory diseases (in partic. inflammatory bowel disease), or AIDS. The invention can also be used to treat diabetes type I, periodontal disease, skin diseases, liver diseases. uveitis, rheumatic diseases (in partic. rheumatoid arthritis), atherosclerosis, vasculitis or multiple sclerosis. In partic. the compsn. is useful for treating tumours, viral infections and bacterial infections. Admin. is parenteral, oral or topical daily or weekly.

Dwg.0/0

Derwent World Patents Index

© 2004 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 9915434

THIS PAGE BLANK (USPTO)

B2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-506322

(43) 公表日 平成8年(1996)7月9日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 31/70	A E D	9454-4C	
	A B E		
	A B F		
	A B G		
	A C J		

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 180 頁) 最終頁に続く

<p>(21) 出願番号 特願平6-512329</p> <p>(86) (22) 出願日 平成5年(1993)11月9日</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)5月10日</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US93/10868</p> <p>(87) 国際公開番号 WO94/11006</p> <p>(87) 国際公開日 平成6年(1994)5月26日</p> <p>(31) 優先権主張番号 974, 750</p> <p>(32) 優先日 1992年11月10日</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p> <p>(31) 優先権主張番号 096, 739</p> <p>(32) 優先日 1993年7月23日</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(71) 出願人 イエダ リサーチ アンド ディベロップ メント カンパニー リミテッド イスラエル国 76100 レホヴォット ビ ー. オー. ボックス 95</p> <p>(71) 出願人 コーヘン, イルン アール. イスラエル国 76100 レホヴォット ハ ンキン ストリート 11番地</p> <p>(71) 出願人 リダー, オファー イスラエル国 76100 レホヴォット, ゴ ードン ストリート 21番地</p> <p>(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)</p>
---	--

最終頁に続く

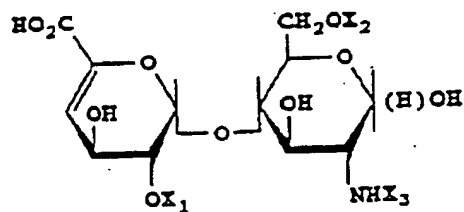
(54) 【発明の名称】 サイトカイン活性の調節のための組成物

## (57) 【要約】

宿主のサイトカイン活性を調節するための、実質的に精製された形のカルボキシル化および/または硫酸化オリゴ糖から成る物質、該物質を含む組成物および該物質の使用方法を開示する。例えば、腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の分泌は、実質的に精製された形の特定のオリゴ糖から成る物質またはそれらの組成物を宿主に投与することにより、選択的に阻害または促進され得る。かくして、本発明は、TNF- $\alpha$  のような活性サイトカイン分泌の誘導を伴う病理学的過程を予防および/または治療するための医薬組成物ならびにそれらの使用に関する。また、本発明は、病原体を含む活性化剤の存在に対して宿主による望ましい免疫系関連応答を開始させることに関する。本発明の物質および医薬組成物は、一般には0.1mg/kg (ヒト) 以下の極低有効量で、毎日投与されるか、または約5~8日の間隔で、好ましくは週1回投与される。

## 【特許請求の範囲】

## 1. 式 (I)



〔式中、 $X_1$ は水素または硫酸基であり、 $X_2$ は水素または硫酸基であり、そして $X_3$ は硫酸基またはアセチル基であるが、ただし、 $X_3$ が硫酸基であるときは、 $X_1$ または $X_2$ の少なくとも一方が硫酸基であり、そして $X_3$ がアセチル基であるときは、 $X_1$ と $X_2$ の両方が硫酸基である〕

で表される二糖またはその薬学的に許容される塩、および製剤学的に許容される担体を含む、活性TNF- $\alpha$ の生産を阻害するための医薬組成物。

2. 前記の二糖が2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-ウロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェートグルコサミンである、請求項1に記載の医薬組成物。

3. 前記の二糖が4-デオキシ-4-エン-ウロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェート-6-O-スルフェートグルコサミンである、請求項1に記載の医薬組成物。

4. 前記の二糖が2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-ウロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェ

ート-6-O-スルフェートグルコサミンである、請求項1に記載の医薬組成物。

5. 前記の二糖が2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-ウロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-アセチル-6-O-スルフェートグルコサミンである、請求項1に記載の医薬組成物。

6. 4-デオキシ-4-エン-ウロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-アセチルグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩および製剤学的に許

容される担体を含有する、活性TNF- $\alpha$ の生産を促進するための医薬組成物。

7. 非経口投与に適している、請求項1または6に記載の医薬組成物。

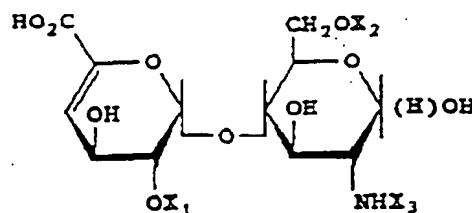
8. 経口投与に適している、請求項1または6に記載の医薬組成物。

9. 局所投与に適している、請求項1または6に記載の医薬組成物。

10. N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-ウロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩から成り、N-硫酸化されている場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物および製剤学的に許容される担体を含有する、活性TNF- $\alpha$ の生産を阻害するための医薬組成物。

11. 非硫酸化N-アセチル化4-デオキシ-4-エン-ウロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩および製剤学的に許容される担体を含有する、活性TNF- $\alpha$ の生産を促進するための医薬組成物。

12. 有効量の式(I)



〔式中、 $X_1$ は水素または硫酸基であり、 $X_2$ は水素または硫酸基であり、そして $X_3$ は硫酸基またはアセチル基であるが、ただし、 $X_3$ が硫酸基であるときは、 $X_1$ または $X_2$ の少なくとも一方が硫酸基であり、そして $X_3$ がアセチル基であるときは、 $X_1$ と $X_2$ の両方が硫酸基である〕

で表される二糖またはその薬学的に許容される塩を被験者に投与することを含む、被験者における活性サイトカインの生産を阻害する方法。

13. 有効量の4-デオキシ-4-エン-ウロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-アセチルグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である二糖を被験者に投与することを含む、被験者における活性サイトカインの生産を促進する方法。

14. 前記の化合物またはその薬学的に許容される塩を毎日投与する、請求項12または13に記載の方法。

15. 前記の化合物またはその薬学的に許容される塩を週1回投与する、請求項12または13に記載の方法。

16. 前記の化合物またはその薬学的に許容される塩を非経口的、経口的または局所に投与する、請求項12または13に記載の方法。

17. 有効量の請求項10の医薬組成物を被験者に投与することを含む、

被験者における活性サイトカインの生産を阻害する方法。

18. 有効量の請求項11の医薬組成物を被験者に投与することを含む、被験者における活性サイトカインの生産を促進する方法。

19.  $\text{TNF-}\alpha$  の不適当な生産によって引き起こされるか、または  $\text{TNF-}\alpha$  の不適当な生産に関連した医学的症状を予防または治療する医薬組成物を調製するための、N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-ウロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩から成り、N-硫酸化されている場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物の使用方法。

20.  $\text{TNF-}\alpha$  の生産増加に応答する医学的症状を治療する医薬組成物を調製するための、非硫酸化N-アセチル化4-デオキシ-4-エン-ウロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である化合物の使用方法。

21. N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-ウロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩であり、N-硫酸化されている場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物の有効量を被験者に投与することを含む、被験者における活性サイトカインの不適当な生産によって引き起こされるか、または活性サイトカインの不適当な生産に関連した医学的症状を予防または治療する方法。

22. 非硫酸化N-アセチル化4-デオキシ-4-エン-ウロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である化合物の有効量



を被験者に投与することを含む、被験者における活性サイトカインの生産増加に  
応答する医学的症状を治療する方法。

23. 前記の化合物が2- $\text{O}$ -スルフェート-4-デオキシ-4-エン-ウロン酸  
-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェートグルコサミンである、  
請求項19または21に記載の方法。

24. 前記の化合物が4-デオキシ-4-エン-ウロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-  
デオキシ-2-N-スルフェート-6- $\text{O}$ -スルフェートグルコサミンである、  
請求項19または21に記載の方法。

25. 前記の化合物が2- $\text{O}$ -スルフェート-4-デオキシ-4-エン-ウロン酸  
-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェート-6- $\text{O}$ -スルフェ  
ートグルコサミンである、請求項19または21に記載の方法。

26. 前記の化合物が2- $\text{O}$ -スルフェート-4-デオキシ-4-エン-ウロン酸  
-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-アセチル-6- $\text{O}$ -スルフェートグ  
ルコサミンである、請求項19または21に記載の方法。

27. 前記の化合物が4-デオキシ-4-エン-ウロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-  
デオキシ-2-N-アセチルグルコサミンである、請求項20または22に記載の方  
法。

28. 前記の医学的症状が自己免疫疾患である、請求項19または21に記載の方法。

29. 前記の医学的症状がインシュリン依存性糖尿病、歯周病、炎症性腸疾患、皮  
膚病、ブドウ膜炎、リウマチ様疾患、慢性炎症、多発性硬化症、エリテマトーデ  
ス、アテローム硬化症、関節炎、脈管炎およびアレルギーより成る群から選ばれ  
る、請求項19または

21に記載の方法。

30. 前記の医学的症状が新生物、ウイルス感染症、バクテリア感染症または真菌  
感染症である、請求項20または22に記載の方法。

31. 前記の医学的症状が基底皮膚癌、扁平上皮癌またはメラノーマである、請求  
項20または22に記載の方法。

32. 前記のサイトカインがIL-1、IL-6、IL-8またはTNF- $\alpha$ より

成る群から選ばれる、請求項12、13、17、18、21または22に記載の方法。

33. N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-ウロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩であり、N-硫酸化されている場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物の有効量を被験者に投与することを含む、被験者におけるインシュリン依存性糖尿病、歯周病、炎症性腸疾患、皮膚病、ブドウ膜炎、リウマチ様疾患、慢性炎症、多発性硬化症、エリテマトーデス、アテローム硬化症、関節炎、脈管炎およびアレルギーより成る群から選ばれる医学的症状を治療する方法。

34. N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-ウロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩であって、N-硫酸化されている場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物、および製剤学的に許容される担体を含有する、インシュリン依存性糖尿病、歯周病、炎症性腸疾患、皮膚病、ブドウ膜炎、リウマチ様疾患、慢性炎症、多発性硬化症、エリテマトーデス、アテローム硬化症、関節炎、脈管炎およびアレ

ルギーより成る群から選ばれる医学的症状を治療するための医薬組成物。

35. 単位投与形態をしている、請求項34に記載の医薬組成物。

36. N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-グルクロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩であって、N-硫酸化されている場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物の有効量を被験者に投与することを含む、被験者における同種異系移植片拒絶を抑制する方法。

37. 前記の同種異系移植が臓器移植である、請求項36に記載の方法。

38. 前記の臓器が心臓、肝臓、腎臓または骨髄である、請求項37に記載の方法。

39. 前記の同種異系移植が皮膚移植である、請求項36に記載の方法。

40. N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-グルクロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩であって、N-硫酸化されてい

る場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物の有効量を被験者に投与することを含む、被験者における接着分子の発現を抑制する方法。

41. 前記の接着分子がICAM-1またはELAM-1である、請求項40に記載の方法。

42. 培地中でヒトCD<sup>+</sup>T細胞を様々な濃度の被験物質と共にプレインキュベートし、被験物質の不在下でT細胞によるTNF- $\alpha$ の分泌を引き出すのに効果的な活性化剤を一定量加え、十分な時間の後で培地を回収し、その後培地中のTNF- $\alpha$ の活性を検査

することを含む、活性TNF- $\alpha$ の分泌に与える被験物質の効果を定量化するためのin vitroバイオアッセイ。

43. 被験者におけるサイトカイン活性を阻害または促進するのに有効な量の物質および製剤学的に許容される担体を含有する被験者におけるサイトカイン活性を調節するための医薬組成物であって、該物質はカルボキシル化および／または硫酸化オリゴ糖またはその薬学的に許容される塩から成り、かつ、0～約2  $\mu$ g/g（マウス）の範囲の様々な投与量の該物質で処理したマウスの相対的実験DTH反応を測定するin vivoバイオアッセイで測定したとき、ゼロ以外の“R”値を示すものである、上記の医薬組成物。

44. 前記の物質が被験者におけるサイトカイン活性を阻害するのに効果的で、ゼロ以外の阻害“R”値を示すものである、請求項43に記載の医薬組成物。

45. 前記の物質が被験者におけるサイトカイン活性を促進するのに効果的で、ゼロ以外の促進“R”値を示すものである、請求項43に記載の医薬組成物。

46. 前記のオリゴ糖が二糖である、請求項43、44または45に記載の医薬組成物。

47. 前記のオリゴ糖がカルボキシル化されている二糖である、請求項43、44または45に記載の医薬組成物。

48. 前記のオリゴ糖がカルボキシル化および硫酸化されている二糖である、請求項43または44に記載の医薬組成物。

49. 前記のオリゴ糖がカルボキシル化されているが、硫酸化されていない二糖で

ある、請求項45に記載の医薬組成物。

50. 前記のサイトカインがIL-1、IL-6、IL-8およびT

NF- $\alpha$ より成る群から選ばれる、請求項43、44または45に記載の医薬組成物。

51. 前記のサイトカインがTNF- $\alpha$ である、請求項46に記載の医薬組成物。

52. 前記の物質がH-1020またはその薬学的に許容される塩である、請求項44に記載の医薬組成物。

53. 前記の物質がH-9517またはその薬学的に許容される塩である、請求項44に記載の医薬組成物。

54. 前記の物質がH-9392またはその薬学的に許容される塩である、請求項44に記載の医薬組成物。

55. 前記の物質がH-9267またはその薬学的に許容される塩である、請求項44に記載の医薬組成物。

56. 前記の物質がH-0895またはその薬学的に許容される塩である、請求項45に記載の医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

サイトカイン活性の調節のための組成物関連出願のクロスリファレンス

本出願は、1993年7月23日に提出された米国出願第08/096,739号の一部継続出願であり、これは、1992年11月10日に提出された米国出願第07/974,750号の一部継続出願であり、順に、これは1992年5月1日に提出された米国出願第07/878,188号の一部継続出願であり、これらの全ては本明細書に文献として採用される。

## 1. 発明の技術分野

本発明は、サイトカイン活性の調節のための物質、その組成物、及び方法、例えば、腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 活性のアップレギュレーション又はダウンレギュレーションに関する。特に、物質及び医薬的に許容可能な組成物は、有効量で宿主に投与された場合は、宿主細胞による活性TNF- $\alpha$ の分泌を阻害又は促進するいずれかのものを開示する。

宿主の免疫エフェクター細胞（例えば宿主の活性化マクロファージ）による活性サイトカイン、例えばTNF- $\alpha$ の分泌は、本発明の方法によって調節されるものと考えられる。

本発明はまた、病理学的過程の抑制及び／又は処置、あるいは、換言すればサイトカイン産生の誘導、分泌、及び／又は活性を伴う有用な免疫系関連反応の開始のための方法に関する。本発明の選択された組成物は、5～8日間の間隔で投与されるべき低分子量ヘパリン (LMWH) の有効な低用量を含む。さらに、別の組成物は、LMWH、酵素により分解されたヘパリン及び酵素に

より分解された細胞外マトリックス (DECM) のクロマトグラフィーによる分離及び精製を含む各種の初期原料から得られる、実質的に精製された形態におけるカルボキシル化及び／又は硫酸化オリゴ糖を含む物質を包含する。

個々に、特に非経口、経口、又は局所投与に特に適したその物質、それを含む組成物、及び医薬組成物は、T細胞特異抗原、T細胞マイトジェン、マクロファージ活性化剤、残留細胞外マトリックス (RECM)、フィブロネクチン、ラミニン又はその同等物を含む（これらに限定されない）免疫エフェクター細胞活性

化剤による活性化に応答して、*in vitro*で休止T細胞及び／又はマクロファージによるTNF- $\alpha$ の分泌を阻害又は促進させる。*In vivo*のデータにおいて、実験的遅延型過敏症(DTH)の抑制を示すこともまた、*in vitro*の結果の更なる支持において示される。

## 2. 発明の背景技術

### 2. 1. 腫瘍壊死因子 $\alpha$

単球(マクロファージ)及びTリンパ球により産生されるサイトカインであるTNF- $\alpha$ は、炎症反応を生ずる因子のカスケードにおける重要な要素であり、病理学的状態の主要な編成者として多くの多面的効果を有する(Beutler, B. and Cerami, A., *Ann. Rev. Immunol.* (1989) 7: 625-655)。

TNF- $\alpha$ の生物学的効果は、その濃度及び産生部位に依存する。低濃度では、TNF- $\alpha$ は望ましい恒常性及び防御機能を生じ得る。しかし、高濃度では、TNF- $\alpha$ は全身的に又は特定の組織において他のサイトカイン、特にインターロイキン-1 (I

L-1)とともに作用して多数の炎症反応を悪化させることもあり得る。

以下の活性は、TNF- $\alpha$ によって(IL-1とともに)誘導されたものとして示されてきた：発熱、スロー波睡眠(slow-wave sleep)、血流力学的ショック(hemodynamic shock)、急性期蛋白質生成の増加、アルブミン生成の減少、血管内皮細胞の活性化、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の発現増加、リボタンパク質リパーゼの減少、チトクロームP450の減少、血漿亜鉛及び鉄の減少、繊維芽細胞の増殖、滑液細胞コラゲナーゼの増加、シクロオキシゲナーゼ活性の増加、T細胞及びB細胞の活性化、並びにサイトカインであるTNF- $\alpha$ 自身、IL-1、IL-6及びIL-8の分泌の誘導。実際、これらサイトカインの生理学的効果は相互関係があるということが研究により示された(Philip, R. and Epstein, L. B., *Nature* (1986) 323 (6083) : 86-89; Wallach, D. et al., *J. Immunol.* (1988) 140 (9) : 2994-2999)。

TNF- $\alpha$ がその効果をどのように働かせるかは、詳細には知られていないが、かかる効果の多くは、細胞を刺激して細胞膜のアラキドン酸からプロスタグラ

ンジン及びロイコトリエンを生成させるTNF- $\alpha$ の能力と関係するものと考えられる。

TNF- $\alpha$ は、その多面的な効果の結果として、体の多くの異なる組織において多様な病理学的状態に影響を及ぼしている。血管において、TNF- $\alpha$ は出血性ショックを増進させ、内皮細胞トロンボモジュリンをダウンレギュレートし、そして凝血促進活性を増大させる。TNF- $\alpha$ は、血管壁への白血球及び恐らく血

小板の接着を引き起こし、それゆえに、アテローム硬化症及び血管炎に導く過程を促進しうる。

TNF- $\alpha$ は血液細胞を活性化し、好中球、好酸球、単球／マクロファージ並びにT及びBリンパ球の接着を引き起こす。IL-6及びIL-8を誘導することにより、TNF- $\alpha$ は炎症細胞の走化性及び組織中への侵入を増大させる。従って、TNF- $\alpha$ は自己免疫疾患の組織損傷、アレルギー及び移植片拒絶においてある役割を有する。

TNF- $\alpha$ は、含脂肪細胞の代謝活性を調節し、癌、慢性感染症、慢性心疾患、及び慢性炎症に伴う消耗及び悪液質に寄与することからカケクチンとも呼ばれている。TNF- $\alpha$ はまた、脂肪組織の消耗を増大させる一方、食欲を抑制することにより食欲不振の役割も有する。

TNF- $\alpha$ は骨格及び心筋で代謝効果を有する。肝臓でも顕著な効果を有する：アルブミン及びチトクロームP450の代謝を低下させ、フィブリノーゲン、1-酸糖蛋白質及び他の急性期蛋白質の産生を増加させる。腸の壊死も引き起こすことができる。

中枢神経系において、TNF- $\alpha$ は、脳血液関門を通過し、発熱、深い睡眠及び食欲不振を誘導する。増加したTNF- $\alpha$ の濃度は、多発性硬化症と関連する。TNF- $\alpha$ は更に、副腎出血を引き起こし、ステロイドホルモンの生成に影響を及ぼし、皮膚におけるコラゲナーゼ及びPGE-2を増加させ、そして破骨細胞を活性化させることにより骨及び軟骨の破壊を引き起こす。

要するに、TNF- $\alpha$ は、自己免疫疾患、移植片拒絶、血管炎及びアテローム

硬化症における多くの望ましくない炎症状態の病

因と関連する。TNF- $\alpha$ は、心疾患及び癌への応答の役割を有し得る。これらの理由について、多様な病気を調節するための手段としてTNF- $\alpha$ の生成、分泌、又は活性形態の有用性を調節する方法が要求されている。

免疫系の第一の機能は、細菌のごとき外部侵入者による感染に対して個体を保護することである。しかし、個体自身の組織を攻撃することもあり、自己免疫疾患として知られる病理学的状態を導く。他の個体からの組織に対する個体の免疫系の攻撃的な反応は、移植された臓器の所望されない拒絶の陰に隠れている理由である。外部物質に対するかかる系の過度の反応性は、喘息、鼻炎及び湿疹のような兆候を伴うアレルギーを引き起こす。

これら反応を支配する細胞はリンパ球、主として活性化Tリンパ球であり、それらが指揮する病理学的炎症反応は、活性化Tリンパ球が標的組織へ、及び標的組織から、血管壁を通して移動する能力に依存する。従って、リンパ球が血管壁に接着し、そして血管壁を通過する能力を低下させることは、自己免疫攻撃、移植片拒絶及びアレルギーを阻止するかもしれない。これは、今日使用された治療と比較してより好ましい効果及び低減した副作用をもたらす可能性がある新しい治療原理を提示するであろう。

アテローム硬化症及び血管炎は、病理学的血管炎症の慢性及び急性の症例である。アテローム硬化症は、動脈の脈管内膜の肥厚及び硬直を伴い、心疾患、心筋梗塞、脳梗塞及び脈管病に至る。そして、西側諸国における罹病及び死亡の主要な原因を表す。病理学的には、アテローム硬化症は、ゆっくり、かつ慢性的に脂肪及び石灰質の蓄積により引き起こされる障害として進行する。緘

維組織の増殖により、最終的に血管内腔の突然の閉塞をもたらす急性状態に至る。

TNF- $\alpha$ は、in vitroでヒト免疫不全ウイルス(HIV)の複製を容易にし、増強し(Matsuyama, T. et al., J. Virol. (1989) 63 (6) : 2504-2509; Michihiko, S. et al., Lancet (1989) 1 (8648) : 1206-1207)、そしてHIV-



1 遺伝子発現を刺激し、このため、HIV-1に潜在的に感染した個体において、臨床的にエイズの発症の引き金となることが示された (Okamoto, T. et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses (1989) 5 (2) :131-138)。

従って、TNF- $\alpha$ は大いに有利であるが、一部分が炎症反応であるように、また不利でもある。恐らく、その生理学的機能を理解する過程で、全体として炎症の目的をいっそう良く理解し、“TNF- $\alpha$ 欠乏”及び“TNF- $\alpha$ 過剰”が得られる状況を見抜くことができるかもしれない。こうして、このホルモンの産生を伴う病気への合理的かつ特異的治療のアプローチを如何に最善に計画するかは、すぐ間近であろう。

## 2. 2. ヘパリン

ヘパリンは、ポリアニオン性硫酸化多糖のグリコサミノグリカンであり、血液凝固を防止するために抗血栓剤として臨床的に使用される。動物モデルにおいて、ヘパリンは、自己免疫Tリンパ球がその標的器官に到達する能力を低下させることが示された (Lider, O. et al., Eur. J. Immunol. (1990) 20 : 493-499) 。ヘパリンはまた、低用量 (マウスについては5  $\mu$ g及びラットについては20  $\mu$ g) で1日1回注射して使用すると、ラットにおいて

実験的自己免疫疾患を抑制し、マウスでの皮膚移植モデルにおいて同種異系移植片の生着を長くすることが示された (Lider, O. et al., J. Clin. Invest. (1989) 83 : 752-756)。

観察された効果に隠れている作用機構は、血管壁の通過に必要な酵素、主として酵素ヘパラーゼ (血管の内表面となる内皮下細胞外マトリックス (ECM) のグリコサミノグリカン成分を特異的に攻撃する) のTリンパ球による放出の阻害を伴うものと考えられている (Naparstek, Y. et al., Nature (1984) 310 : 241-243) 。ヘパラーゼ酵素の発現は、血管壁を通過し、実験的自己免疫脳脊髄炎 (EAE) 病モデルにおいて脳を攻撃する自己免疫Tリンパ球の能力と関連する。

ヨーロッパ特許出願EP 0114589 (Folkman et al.) は、(1) ヘパリン又は六糖若しくはそれ以上のヘパリン断片、(2) コルチゾン又はヒドロコルチゾン若

しくはヒドロコルチゾンの11- $\alpha$ 異性体を実質的に含む活性薬剤において、哺乳動物の血管形成を阻害する組成物を記載する。その明細書によれば、ヘパリン単独又はコルチゾン単独では有効ではなく、両者の組み合わせのみが求める効果を与える。血管形成と自己免疫疾患との間に関係があるという文献的証拠はないが、かかる特許出願の5ページの記載では、血管形成を乾癬及び関節炎と関連させており、1日当たり25,000~47,000単位の高用量のヘパリン（即ち、約160~310 mg/日）の使用を示唆している。

Horvath, J. らは、Aust. N.Z.J. Med. (1975) 5 (6) : 537-539において、早期の腎同種異系移植片の機能について、皮下ヘパリンの抗凝血以下の用量の効果を記載する。1日の用量は高く（50

00U又は約33mg）、研究の結論は、抗凝血以下の用量におけるヘパリンは早期移植片機能又は移植片生着に対して効果はなく、大量の出血の合併症と関連するかも知れないということである。

Toivanen, M. L. ら (Meth. and Find. Exp. Clin. Pharmacol. (1982) 4 (6) : 359-363) は、高用量（1000U/ラット又は約7 mg/ラット）で、ラットのアジュバント関節炎の阻害についてヘパリンの効果を調べた。そして、ヘパリンはラットアジュバント関節炎の重症度を増加させることがわかった。

PCT特許：W088/05301 (Parish et al.) として公開された、出願PCT/AU88/00017は、抗転移剤及び抗炎症剤として使用するための、エンドグリコシラーゼ活性をブロック又は阻害する硫酸化多糖、例えばヘパラーゼ活性について記載する。ごくわずかな抗凝固活性しかもたなかったヘパリン及びヘパリン誘導体、例えば過ヨウ素酸酸化し、還元したヘパリンは、1日当たり1.6-6.6mg/ラットの範囲内の用量で使用し、連続的な注入（成人ヒト患者では1日当たり75-308mgに相当する）によって投与すると、抗転移及び抗炎症活性を有することが示された。

ヘパリン及びヘパラン硫酸は、密接に関連するグリコサミノグリカン巨大分子である。低分子量ヘパリン（LMWH）と呼ばれるこれら重合性巨大分子の分解産物は、血液凝固系で親の巨大分子と同じか又はそれ以上の薬理効果を有し得る

。更に、重合体の基本二糖サブユニット、グルクロン酸及びN-アセチルグルコサミンの広範囲であるが不完全な合成後プロセッシングがあるため、LMWHは大きさのみならず、化学的組成の異種混合物であろう (Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therap

eutics, 8th Ed., (Pergamon Press, New York, 1990) pp. 1313-1315を参照のこと)。抗凝固剤として有用なヘパリンから低分子量の産物を得るための方法は、かかる文献に記載されている。これらの方法は、in vivoでの持続性又はそれら産物の出血性副作用の範囲を最適化することが要求される (例えば、Alpino R. R., et al., 米国特許第5,010,063号; Choay, J., et al., 米国特許第4,990,502号; Lopez, L. L., et al., 米国特許第4,981,955号を参照のこと)。別の者は、低分子量産物を得るためにアフィニティクロマトグラフ法の使用を教示する (例えば、Rosenberg, R. D., et al., 米国特許第4,539,398号及びJordan, R.E., et al., 米国特許第4,446,314号を参照のこと)。

Folio Haematol. (Leipz), (1987) 114: 429-436に報告したPsuja, P. は、ヘパリンと細胞表面との相互作用に及ぼすヘパリンの異質性の効果を研究した。Psujaは、培養した内皮細胞で見つかったLMWH ( $IC_{50} = 5.6 \mu M$ ) に対する適当な親和性レセプターがあることを報告した。しかし、彼はこれらのレセプターに結合するLMWHの画分の上限が全LMWHの1%未満であると決定した。

別の研究者は、培養細胞の各種のタイプの代謝に及ぼすLMWHの効果を示した。Asselot-Chapel, C.らは、Biochem. Pharmacol. (1989) 38: 895-899及びBiochem. Biophys. Acta, (1989) 993: 240-244の中で、LMWHは、培養平滑筋細胞がI型コラーゲンに対するIII型コラーゲンの比率及びフィブロネクチンの合成を減少させることを報告する。Rappaport, R. は米国特許第4,889,808号において、LMWHは、無血清中で培養されたヒ

ト二倍体肺繊維芽細胞が組織プラスミノゲンアクチベーター及び関連タンパク質の分泌増加によりLMWHと反応させることができることを教示する。

複合多細胞系に対するLMWHの効果が報告されている。Folkmanら及びLider

らは、E P O出願0114589及びJ. Clin. Invest. (1989) 83:752:756において上記のことを述べている。さらに、Diferrante, N.は、公開された国際出願WO 90/03791において、C8166形質転換ヒトリンパ球 (A L L) の培養物中でH I Vの再生産を阻害するためのL M W Hの使用を教示する。しかし、細胞の代謝についてのL M W Hの効果を研究したという先行技術の実験では、どれもL M W Hの異質性が拮抗性効果を生ずるかもしれないということを考えてはいない。さらに、実質的に純粋なオリゴ糖物質の使用に基づくサイトカイン活性の調節効果については示されておらず示唆もされていない。

### 3. 発明の概要

本発明においては、哺乳動物患者のサイトカイン活性を調節することができる、実質的に精製された形のカルボキシル化および／または硫酸化オリゴ糖から成る物質を開示する。特に、この物質は、(a) 0～約 $2\mu\text{g/g}$  (マウス) の範囲の様々な投与量の該物質で処理したマウスにおいて実験的D T H反応の相対阻害を測定するin vivo バイオアッセイで測定したとき、約 $200,000\% \times (\mu\text{g/g})^{-1}$ またはそれ以上の一定の阻害“R”値、あるいは(b) 0～約 $1 \times 10^7\text{pg/ml}$ の様々な濃度の該物質の存在下で活性化ヒトC D 4<sup>+</sup>T細胞により分泌されるT N F- $\alpha$ の相対活性を測定するin vitro バイオアッセイで測定したとき、約 $0.03\% \times (\text{pg/ml})^{-1}$ またはそれ以上の一定の促進“R”値を示すものである。好ましい物質は300,000、400,000、500,000 および600,000 $\% \times (\mu\text{g/g})^{-1}$ またはそれ以上より成る群から選ばれるin vivo阻害“R”値を示す。

さらに、活性T N F- $\alpha$ の分泌に対して阻害効果を有する本発明の物質は、0～約 $1 \times 10^7\text{pg/ml}$ の様々な濃度の該物質の存在下で活性化ヒトC D 4<sup>+</sup>T細胞により分泌されるT N F- $\alpha$ の相対活性を測定するin vitro バイオアッセイで測定したとき、少なくとも約 $0.4\% \times (\text{pg/ml})^{-1}$ の一定の阻害“R”値を示す。

本発明の一つの実施態様において、炭水化物またはオリゴ糖は約3000ダルトンより低い分子量を有し、好ましくは該分子量は約400～2000ダルトン

の範囲にあり、約400～1100ダルトンの範囲が最も好ましい。一般的に、  
バイオアッセイ

(以下で詳述する)で測定した際にTNF- $\alpha$ 活性を阻害する本発明の物質は種々の糖単位の分子を含み、その活性の基本単位は二糖類と関係がある。しかし、活性の基本二糖単位を含む約10個までの糖単位の比較的大きいオリゴ糖鎖もTNF- $\alpha$ 活性を阻害するように作用する。一方、観察されたTNF- $\alpha$ 活性を促進させるように作用する本発明の物質は一般に2つのタイプのものであって、すなわち、(i)非凝集状態で阻害活性を示す低分子量分子の比較的高分子量の凝集物、および(ii)硫酸基を失った(すなわち、少なくとも部分的に脱硫酸化された)二糖または単糖である。

精製した場合には、これらの物質または該物質を含む組成物は相反する作用つまり拮抗作用を示す他の物質を実質的に含まない。かくして、実質的に精製された形で阻害活性(“ダウン”レギュレーション)を示す物質は、他の物質のみならず、一般には、促進を示す物質や“ダウン”レギュレーターの阻害活性を遅延させる物質を実質的に含まないだろう。もちろん、促進物質(すなわち、“アップ”レギュレーター)の場合にはこの状況は逆になり、かかる物質は他の物質、特に“ダウン”レギュレートしたり促進に拮抗する物質を実質的に含まないだろう。

「調節作用」という用語は、一般にIL-1、IL-6、IL-8、特にTNF- $\alpha$ を含むサイトカイン類のin vivoまたはin vitroでの有効性または生じる活性に影響を与える任意の過程のアップレギュレーションとダウンレギュレーションの両方を含むものである。従って、本発明の組成物は、TNF- $\alpha$ の宿主産生、TNF- $\alpha$ の宿主分泌、TNF- $\alpha$ の細胞外有効性、または宿主

内の活性型TNF- $\alpha$ に対して調節作用を及ぼすことができる。例えば、理論によって拘束されることを望まないが、本発明の組成物は、TNF- $\alpha$ と結合してそのコンホメーションを変え、結果的にその生物学的活性に影響を及ぼすタンパク質のような物質の分泌を引き出すように作用するのかもしれない。また、本発

明の組成物は、活性化されたT細胞またはマクロファージに入り込んだときに、特定のオリゴヌクレオチド配列と結合して転写または翻訳過程に影響を与え、最終的にタンパク質の合成を変化させるのかもしれない。あるいは、本組成物は細胞表面受容体への結合を介して作用するのかもしれない。

以下の論議を分かりやすくするために、中でも、「活性TNF- $\alpha$ の分泌」または「TNF- $\alpha$ の活性」の調節に言及しておくが、これらの用語には、関与する実際の作用機構、または本発明の物質および組成物がTNF- $\alpha$ 活性の観察される促進または阻害に影響を及ぼす実際の方法を包含するかなり広範な意味が付随していることを理解すべきである。

本発明の物質は、生きている生物を含む天然源から得ることのできる、カルボキシル化および／または硫酸化オリゴ糖部分を含むものである。例えば、活性物質は低分子量ヘパリン（LMWH）画分から、並びに酵素、例えば動物（哺乳類）または微生物（バクテリア）由来のヘパラーゼの作用により分解された細胞外マトリックスから単離され、精製されたものである。活性物質の他の供給源は酵素により処理されたヘパリン（エンドグリコシラーゼ分解ヘパリン）である。

それゆえ、「実質的に精製された形」という用語は、オリゴ糖

物質から非活性成分または相反する作用を有する成分を除くために、および酵素的分解により得られるような混合物または上清から1種以上の活性成分を単離するために、特別の工程が行われたことを意味する。特に、本発明において特許請求された物質は厳格なクロマトグラフ法により得られ、その場合、低圧サイズ排除ゲルクロマトグラフィー（すなわち、セファデックスカラムでのクロマトグラフィー）が精製法の初期段階となる。低圧分離に続いて、個々の成分オリゴ糖を単離するために高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）を行う。好ましいことに、これらの工程は個々の活性物質の実質的に均一な精製をもたらした。

このような好ましい精製工程は、例えば、活性物質を含む混合物（例えば、低圧ゲルクロマトグラフィーから得られた画分）をゲル透過HPLCまたは強アニオン交換（SAX）HPLCカラムに通すことを含む。こうして、二、三、四、五または六糖類より成る群から選ばれるオリゴ糖類、好ましくは二糖類を含む物

質が観察され、単離された。本発明のオリゴ糖類はカルボキシル化および／または硫酸化されており、それゆえ負に荷電している。本発明の特定の実施態様は、優先的に、3個の負に荷電した基を有する二糖類を含む。特異的阻害活性を示すものは約400～2000、好ましくは約400～1100の範囲の分子量を有する。

本発明は、また、活性TNF- $\alpha$ の分泌に与える被験物質の効果を定量化するためのバイオアッセイを提供する。このバイオアッセイは、培地中でヒトCD<sup>+</sup>T細胞を様々な濃度の被験物質と共にプレインキュベートし、被験物質の不在下でT細胞によるTNF- $\alpha$ の分泌を引き出すのに効果的な活性化剤を一定量加え、

十分な時間の後で培地を回収し、その後培地中のTNF- $\alpha$ の活性を検査する各工程を含んでいる。好ましくは、ヒトCD<sup>+</sup>T細胞は末梢血単核白血球(PBL)から得られるものである。適当な免疫エフェクター細胞活性化剤としては、T細胞特異的抗原、マイトジェン、マクロファージ活性化剤、残留細胞外マトリックス(RECM、以下の第4節で定義される)、ラミニン、フィブロネクチンなどを挙げることができるが、これらに限らない。

本発明は、以下に詳述するin vitroおよびin vivo バイオアッセイにより測定されるような特定の物質の特異的調節活性に基づいている。簡単に述べると、本発明において有用な物質は、用量に依存する活性TNF- $\alpha$ 分泌の誘導に対して調節(阻害または促進のいずれか)活性を示す。すなわち、用量に対する阻害または促進パーセントのプロットは、最大阻害(Inh<sub>max</sub>)または促進(Aug<sub>max</sub>)パーセントが容易に分かるベル形の曲線をもたらす。従って、かかるプロット上の点ごとに、阻害または促進パーセントと濃度または用量との“比率”を計算することができる。その場合に、最大阻害または促進パーセント(すなわち、Inh<sub>max</sub>またはAug<sub>max</sub>)と最大調節パーセント値を生じた被験物質の濃度または用量との比率から“比調節活性”すなわち“R”値を求めることができる。さらに、“R”値はそれぞれのバイオアッセイについて得ることができる。それゆえ、“R”値はin vitroマウス脾細胞アッセイ、ex vivo マウス脾臓アッセイ、in vitroヒ

トPBLアッセイ、および実験的DTH反応に基づくin vivoアッセイから関連させることができる。何の作用も観察されない場合は、ゼロの“R”値が指定される。

本発明の他の目的は、哺乳動物患者に、該患者のサイトカイン活性を阻害または促進するのに有効な量の物質を投与することを含む哺乳動物患者におけるサイトカイン活性の調節方法であり、前記の物質は、実質的に精製された形のカルボキシル化および／または硫酸化オリゴ糖から成り、かつ (a) (i)  $0 \sim 1 \times 10^7 \text{ pg/ml}$  の様々な濃度の該物質の存在下で活性化ヒトCD4<sup>+</sup>T細胞により分泌されるTNF- $\alpha$ の相対活性を測定するin vitroバイオアッセイおよび／または (ii)  $0 \sim 2 \mu\text{g/g}$  (マウス) の範囲の様々な投与量の該物質で処理したマウスにおいて実験的DTH反応の相対阻害を測定するin vivo バイオアッセイで測定したとき、ゼロ以外の一定の阻害“R”値；または (b)  $0 \sim 1 \times 10^7 \text{ pg/ml}$  の様々な濃度の該物質の存在下で活性化ヒトCD4<sup>+</sup>T細胞により分泌されるTNF- $\alpha$ の相対活性を測定するin vitroバイオアッセイで測定したとき、ゼロ以外の一定の促進“R”値を示すものである。

本発明のさらに他の目的は、宿主の治療に有用な医薬組成物を調製するための前記の活性物質の使用方法であり、この方法は、有効量の該物質を含む単位用量（好ましくは、低投与量のもの）を提供するために該物質を製剤学的に許容される担体と組み合わせることを含んでいる。医薬組成物は長期間にわたって、大半でないにしても、有意な割合（例えば、約3日間にわたって約100%）の該物質の初期活性を維持するのに十分な量の安定化剤（例えば、プロタミン）を含んでいてもよい。室温以下の貯蔵温度、例えば約 $-10 \sim 10^\circ\text{C}$ 、好ましくは $4^\circ\text{C}$ の温度で、初期活性の多くが最高4ヵ月間ほど持続する。

本発明の医薬組成物はヒトへの投与を意図しているので、この医薬組成物は無菌であることが好ましい。滅菌は当技術分野でよく知られた任意の方法、例えば、無菌成分の使用、加熱滅菌または無菌フィルターによる本組成物の濾過などで行われる。



さらに、明らかなように、本発明の主な目的は、医学的症状（その重症度が宿主におけるサイトカインの活性により影響され得る症状）を患っている宿主（例えば、哺乳動物患者）を治療する方法を提供することであり、この方法は、かかる宿主に、実質的に精製された形の本発明のオリゴ糖から成る活性物質または該物質から調製され得る医薬組成物を投与することを含んでいる。特定の宿主の医学的症状に応じて、TNF- $\alpha$ の有効性または活性を低下させるか、または逆に、TNF- $\alpha$ の誘導を促進しまたはその活性を促進する、いずれかの物質または組成物が投与される。こうした組成物は低投与量レベルで約5～8日の間隔で、好ましくは週1回、投与することができる。オリゴ糖（例えば、単糖、二糖、三糖または四糖、好ましくは二糖）物質を含有する非経口、経口または局所投与用の医薬組成物は、当業者が日常的な実験によって簡単に決定しうる投与量で、利便性および有効性に応じて毎日投与することもできる。

本発明は、また、活性TNF- $\alpha$ 分泌の誘導を伴う病理学的過程の予防および／または治療用の医薬組成物に関し、この組成物は約5～8日の間隔で投与するために低有効量で存在する低分子量ヘパリン（LMWH）および製剤学的に許容される担体を含有し、該LMWHはT細胞特異的抗原、マイトジェン、マクロファージ活性化剤、残留細胞外マトリックス（ECM）、ラミニン、

フィブロネクチンなどに応答して休止T細胞および／またはマクロファージによる活性TNF- $\alpha$ の*in vitro*分泌を阻害することができる。

本発明の特定の実施態様において、医薬組成物のLMWHは約3000～6000の平均分子量を有し、さらに、5日または7日ごとに投与され得る。

本発明の目的は、また、活性TNF- $\alpha$ 分泌の誘導を伴う病理学的過程の予防および／または治療のために約5～8日の間隔で投与される医薬組成物を提供することであり、この組成物は低有効量で存在する低分子量ヘパリン（LMWH）および製剤学的に許容される担体を含有する。

本発明の活性物質および医薬組成物は、該物質または医薬組成物の不在下または該物質または医薬組成物の投与からの回復後に皮膚へ抗原を適用した後で観察される硬化と比べて、該物質または医薬組成物の投与後約5～7日までに皮膚

へ抗原を適用した後で観察される硬化の減少によって証明されるように、適用抗原に対する実験的遅延型過敏症(DTH)反応を阻止することができる。適用される抗原の例として、破傷風、ミエリン塩基性タンパク質、精製したタンパク質誘導体、オキサゾロンなどが挙げられるが、これらに限らない。

さらに、本発明の目的は、腸内投与(経口または直腸投与を含む)または腸管外投与(局所投与またはエアロゾルによる吸入を含む)を含むがこれらに限らない任意の方法で投与し得る医薬組成物を提供することである。好ましい態様において、本発明の医薬組成物は経口的、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内に投与さ

れる。

かくして、本発明は、例えば、同種異系移植片拒絶を遅延または予防し、そして自己免疫疾患、アレルギー、炎症性疾患(特に、炎症性腸疾患)または後天性免疫不全症候群(AIDS)に関係するような様々な病理学的過程を治療または予防するのに有用である。本発明は、また、I型糖尿病、歯周病、皮膚病、肝臓病、ブドウ膜炎、リウマチ様疾患(特に、リウマチ様関節炎)、アテローム硬化症、脈管炎または多発性硬化症の治療にも有効である。

さらに、本発明は、本発明の物質を投与して活性TNF- $\alpha$ の分泌を促進することによる腫瘍、ウイルス感染症およびバクテリア感染症の治療にも有用である。腫瘍治療の例として、乳癌、結腸癌および前立腺癌、ならびにリンパ腫および他の基底細胞癌が挙げられるが、これらに限らない。バクテリア感染症の治療には、ジフテリア、連鎖球菌、肺炎、淋病、らい病および結核の治療が含まれるが、これらに限らない。同様に、本発明によって治療することができるウイルス感染症の例には、インフルエンザ、肝炎、胃腸炎、単核細胞症、細気管支炎および髄膜炎が含まれるが、これらに限らない。

本発明の特定の医薬組成物には、低有効量の処方されたLMWH活性物質が存在する。一般的に、医薬組成物はLMWH活性物質5mg未満、好ましくは約0.3~3mgの1回の低用量単位を含み、1~1.5mgの1回低用量単位を含むことが最も好ましい。

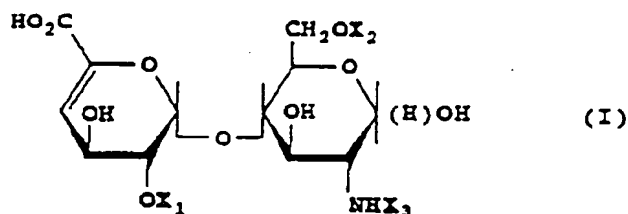
本発明は、また、 $\text{TNF-}\alpha$ 分泌の誘導を伴う病理学的過程の予防および／または治療のために約5～8日の間隔で投与される

医薬組成物を調製するための、免疫エフェクター細胞活性化剤に応答して休止T細胞および／またはマクロファージによる活性 $\text{TNF-}\alpha$ のin vitro分泌を阻害することができる低分子量ヘパリン(LMWH)の使用方法を意図しており、この方法は、低有効量のLMWHを製剤学的に許容される担体と組み合わせることを含んでいる。

本発明のさらに別の目的は、本発明による活性物質の供給源を提供する方法に関し、この方法は、低分子量ヘパリンを分画化し、完全なヘパリンを酵素的に分解する(DH)か、または細胞外マトリックスを酵素的に分解する(DECM)ことを含んでいる。

本発明の更なる目的は、活性 $\text{TNF-}\alpha$ 分泌の誘導を伴う病理学的過程を患っている患者または宿主の治療方法を提供することであり、この方法は、こうした患者または宿主に、上記のような医薬組成物を約5～8日の間隔で、好ましくは週1回、投与することを含んでいる。上述したように、活性オリゴ糖を含有する医薬組成物は毎日または週間隔で投与してもよい。

また、本発明は、式(I)



〔式中、 $X_1$ は水素または硫酸基であり、 $X_2$ は水素または硫酸基であり、そして $X_3$ は硫酸基またはアセチル基であるが、ただ

し、 $X_3$ が硫酸基であるときは、 $X_1$ または $X_2$ の少なくとも一方が硫酸基であり、そして $X_3$ がアセチル基であるときは、 $X_1$ と $X_2$ の両方が硫酸基である〕の二糖またはその薬学的に許容される塩および製剤学的に許容される担体を含有する

、活性TNF- $\alpha$ の産生を阻害するための医薬組成物を提供する。特に、医薬組成物は二糖として2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェートグルコサミン、4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェート-6-O-スルフェートグルコサミン、2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェート-6-O-スルフェートグルコサミン、または2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-アセチル-6-O-スルフェートグルコサミンを含むことができる。

本発明は、また、4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-アセチルグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩および製剤学的に許容される担体を含む、活性TNF- $\alpha$ の産生を促進するための医薬組成物を提供する。もちろん、このような医薬組成物は非経口投与、経口投与または局所投与を含むがこれらに限らない種々の投与経路に適合させることができる。

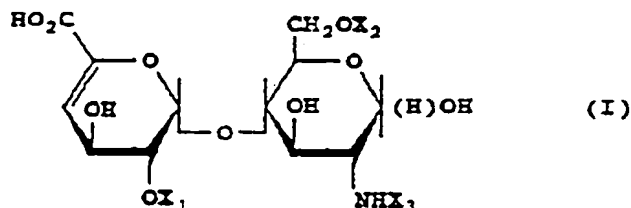
さらに、N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-グルクロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である化合物を含有する、活性TNF- $\alpha$ の産生を阻害す

るための医薬組成物が提供される。こうした化合物は、N-硫酸化されている場合、少なくとも1つの他の硫酸基を有し、N-アセチル化されている場合は、少なくとも2つの硫酸基を有する。対象となる二糖の“ウロン”酸部分の不飽和(C-4とC-5の間の二重結合)のために、本質的に6員環の平面にあるC-6カルボキシル基に関係した立体化学は存在しないことに注意すべきである。それゆえ、C-4とC-5間の二重結合が存在する場合、イズロン酸はグルクロン酸と同一になる。その結果、「ウロン酸」という用語はグルクロン酸またはイズロン酸のいずれかを意図するものである。同様に、「ウロノ基」はイズロノ基またはグルクロノ基のいずれかを意味する。

本発明のさらに他の態様は、非硫酸化N-アセチル化4-デオキシ-4-エン

ーグルクロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩および製剤学的に許容される担体を含有する、活性TNF- $\alpha$ の産生を促進するための医薬組成物に関する。

また、患者（例えば、ヒト患者のような哺乳動物）に、有効量の式（I）



〔式中、 $X_1$ は水素または硫酸基であり、 $X_2$ は水素または硫酸基であり、そして $X_3$ は硫酸基またはアセチル基であるが、ただ

し、 $X_3$ が硫酸基であるときは、 $X_1$ または $X_2$ の少なくとも一方が硫酸基であり、そして $X_3$ がアセチル基であるときは、 $X_1$ と $X_2$ の両方が硫酸基である〕の二糖またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、患者における活性サイトカインの産生を阻害する方法も本発明によって意図される。もう1つの方法は、患者に、有効量の4-デオキシ-4-エン-イズロン酸- $(\alpha-1, 4)$ -2-デオキシ-2-N-アセチルグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、患者における活性サイトカインの産生を促進することに関する。本発明の目的物と一致して、こうした方法は各化合物またはその薬学的に許容される塩の毎日の、好ましくは週1回の投与を含むものである。

上記の方法は、有効量の本発明の医薬組成物を患者に投与することにより、患者における活性サイトカインの産生を阻害または促進するためにも利用できる。

また、本発明は、TNF- $\alpha$ の不適當な産生によって引き起こされるか、またはTNF- $\alpha$ の不適當な産生に関連した医学的症状を予防または治療するための医薬組成物を調製するにあたって、N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-グルクロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である化合物（N-硫酸化されている場合の該化合物は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、N-アセチル化されている場合の該化合物は少なくとも2つの硫酸

基を有する)を使用する方法をも意図している。

TNF- $\alpha$ の産生増加に応答する医学的症状を治療するための

医薬組成物を調製するにあたって、非硫酸化N-アセチル化4-デオキシ-4-エン-グルクロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である化合物を使用する方法も意図される。

同様に、患者における活性サイトカインの不適當な産生によって引き起こされるか、または活性サイトカインの不適當な産生に関連した医学的症状を予防または治療する方法も提供され、この方法は、患者に、N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-グルクロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である化合物(N-硫酸化されている場合の該化合物は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、N-アセチル化されている場合の該化合物は少なくとも2つの硫酸基を有する)を有効量投与することを含んでいる。患者に、非硫酸化N-アセチル化4-デオキシ-4-エン-グルクロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である化合物を有効量投与することを含む、患者における活性サイトカインの産生増加に応答する医学的症状を治療する方法も提供される。かかる治療は自己免疫疾患、腫瘍性疾患またはある種の感染症(ウイルス、バクテリアまたは真菌が引き起こすものを含む)を伴う症例において特に有用である。

本発明の他の目的は、被験者に、N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-グルクロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である化合物(N-硫酸化されている場合の該化合物は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、N-アセチル化されている場合の該化合物は少なくとも2つの硫酸基を有する)を有効量投与することを含む、放射線暴露の有害作用から被験者を保護する方法に関する。一般に、本発明の化合物は

放射線暴露の前に被験者に投与される。最も有利には、開示した化合物の放射線防護特性は放射線療法の間利用される。

さらに、患者に、N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-

エン-グルクロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である化合物（N-硫酸化されている場合の該化合物は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、N-アセチル化されている場合の該化合物は少なくとも2つの硫酸基を有する）を有効量投与することを含む、同種異系移植片拒絶の抑制方法が意図される。もちろん、同種異系移植としては、心臓、肝臓、腎臓または骨髄移植を含むがこれらに限らない臓器移植を挙げることができる。開示した方法は皮膚の移植にも適している。

さらに他の目的は、患者に、N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-グルクロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である化合物（N-硫酸化されている場合の該化合物は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、N-アセチル化されている場合の該化合物は少なくとも2つの硫酸基を有する）を有効量投与することを含む、被験者における接着分子の発現の抑制方法に関する。このような接着分子の例として、ICAM-1またはELAM-1が挙げられるが、これらに限らない。

また、培地中でヒトCD<sup>+</sup>T細胞を様々な濃度の被験物質と共にプレインキュベートし、被験物質の不在下でT細胞によるTNF- $\alpha$ の分泌を引き出すのに効果的な活性化剤を一定量加え、十分な時間の後で培地を回収し、その後培地中のTNF- $\alpha$ の活性を検査することを含む、活性TNF- $\alpha$ の分泌に与える被験物質の効果を定量化するためのin vitroバイオアッセイが開示される。

本発明の更なる目的は、本発明の特定の実施態様の詳細な説明を含む以下の開示をさらに検討することにより、当業者には明らかになるだろう。

#### 図面の簡単な説明

図1は、フラグミン (Fragmin) を種々の投与量で週1回投与により処理したラット群から得られたアジュバント関節炎 (AA) スコアを、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) のみを与えたコントロール群と比較して示す。

図2は、単回処理、1日1回処理、5日間隔処理、週1回処理を含む種々の投与処方ではフラグミン20 $\mu$ gを定量的に投与したラット群から得られたAAスコアを示す。

す。

図3は、ヘパリン (Heparin) およびコントロール (PBS) に対する、フラグミンの週1回投与の効果と比較したものである。

図4は、フラグミン、ヘパリン、またはPBSの1日1回投与の結果を示す。

図5は、フラキシパリン (Fraxiparin) 、フラキシパリン (Fraxiparine) 、およびロベノックス (Lovenox) を含む種々の低分子量のヘパリンを週1回または1日1回処理したマウス群から得られたAAスコアを示す。

図6は、同種異系の心臓移植を受け、そしてフラグミンまたはPBSいずれかの週1回投与も受けたラットの生存率 (%) をプロットする。

図7は、NODマウスの二つの群、すなわちフラグミンを受けた群、PBSのみを受けたもう一つの群の血中グルコース量を示す棒グラフを提示する。

図8は、ヒトボランティアを含むDTH試験の結果を示す。

図9は、活性フラグミンによって示される反応曲線に対する“ベル形”投与量を示す。

図10は、不活化フラグミンによって示される阻害活性の欠損を示す。

図11は、画分F2, F8, F10, およびF15を含む、不活化フラグミンのゲル濾過から得られた種々の画分の206nmにおける吸光度を示す。

図12、12Aおよび12Bは、活性フラグミンである画分F15および画分F10それぞれの、種々の投与量におけるDTH反応へのマウスの感受性に対する影響を示す。

図14は、フラグミンおよびヘパラーゼ分解ECMのセファロース4Bカラム分離から得られた多くの画分の画分番号に対する206nmにおける吸光度を示す。

図13および15は、フラグミンおよびヘパラーゼ分解ECMのセファロース4Bカラム分離からの画分の溶出プロフィールを比較する。

図16は、オリゴ糖産物 (図13の画分5) が、活性TNF- $\alpha$ の分泌を阻害する反応曲線において同様なベル形の投与量を表すことを示す。

図17は、最大の抗-TNF- $\alpha$ 効果の領域が、約5.65と約5.8の間のサブ画分にあることを示す。

図18Aおよび18Bは、フラグミンおよびヘパラーゼ分解ECMのHPLC分離によ



ってそれぞれ得られたクロマトグラムを示す。

図19は、ヘパラーゼ分解ECMのセファロース4Bカラム分離から得られた二つの画分F5およびF8の206nmにおける吸光度を示す。

一方、図20Aおよび20Bは、画分F5のHPLC分離から得られた一つのピークの206nmおよび232nmにおける吸光度をそれぞれ示す。

図21Aおよび21Bは、画分F5から得られたさらなるHPLC画分のUV吸収を示す。

図22は、ヘパラーゼ分解ECMのセファロース4Bカラム分離から得られた画分F7およびF8のUV吸収を示す。

図23は、画分F7およびF8を合わせたもののSAX-HPLCクロマトグラフィーから得られた実質的に純粋なピークを示す。

図24は、図23の“1”と標識されたピークの脱塩調製物から得られた“A23/4”と標識されたもう一つのピークを示す。

図25A、25B、25Cは、シグマ標識されたH-0895、H-1020、およびH-9267から得られた二糖標準物のSAX-HPLCカラム分離から得られたクロマトグラムをそれぞれ示す。

図26は、画分F7およびF8を生成する、ヘパリンのヘパラーゼ(MM5)処理から得られた混合物のセファロース4Bカラム分離を示す。

図27は、PC3ヘパラーゼ単独、およびヘパリン+PC3のセファロース4Bクロマトグラフィーから得られた種々の画分の206nmにおける吸光度を示す。

図28Aおよび28Bは、図26の画分F7のHPLC分離により得られたさらなる画分を示す。

図29は、フラグミンのHPLC分離から得られた画分F90を示す。

一方、図30は、A23/4の時間をおいたサンプルのSAX-HPLC分離から得られたクロマトグラムを示す。

図31は、図23に示すHPLCクロマトグラフィーから得られたECM

由来の二糖サンプル20 $\mu$ gのプロトンNMRスペクトラムを示す。

図32は、図31のサンプルの二次元COSYスペクトラムを示す。

図33は、アノマープロトンに対するシグナルを示す、図31のNMRスペクトラムの拡張部分を示す。

図34および35は、二つの別個のサンプル、すなわち硫酸化合物の存在を示すもの（図34）および部分的に脱硫酸類縁体（図35）の存在を示すもの（図35）のFTIRスペクトラムを示す。

図36Aは、DTT：チオグリセロール（1：1）から成る溶媒基質中の図23から得られたサンプルのメチル化誘導体のマススペクトラムを示す。

図36Bは、溶媒基質のみのマススペクトラムを示す。

図37Aおよび37Bは、メチルニトロベンジルアルコールから成る異なる溶媒基質中の同サンプルのマススペクトラムを示し、図37Aは同サンプルに溶媒基質を加えたもののマススペクトラムであって、図37Bは、溶媒基質のみのマススペクトラムである。

図38は、実験的に誘発したアジュバント関節炎を患っている雌性ルイス（Lewis）ラットのAAスコアを向上させる、二糖9392および1020の効果を比較する実験結果を示す。

図38Aは、実験的に誘発したAAを患っているラットのAAスコアに対する、二糖0895の効果をコントロール（PBS）と比較して示す。

図38Bは、種々のグルコサミン投与量におけるルイスラットのAAスコアの向上に対するグルコサミン投与の効果を示す。

図38Cは、同様に、ルイスラットのAAスコアに対する異なる投与量でのガラクトサミンの効果を示す。

図38Dおよび38Eは、二糖9392で行ったさらなる実験結果を示

し、二糖は、第ゼロ日（即ち、AAの誘発開始日）から始めて週1回または1日1回か、第12日（即ち、ラットがAAを既に患っているとき）のいずれかに投与する。

図38Fおよび38Gは、実験的に誘発したアジュバント関節炎の抑制に対する二糖9392の週1回投与の効果を確認するために、公知の抗炎症剤、デキサメタゾンホスフェートと比較してルイスラット群について行った別々の一連の比較実験の結

果を示す。

図39は、リポ糖 (LPS) 誘発ラット角膜の炎症に対する二糖1020の皮下注射の効果を示す。

図39Aは、種々の投与量におけるグルコサミンの放射防御効果に関する実験結果をコントロール (PBS) と比較して提示する。

図39Bは、種々の投与量における二糖9392の投与を含む同様な放射試験の結果をコントロール (PBS) と比較して提示する。

図40および40Aは、本発明により選択された物質の同種異系移植片拒絶を抑制する能力を表す試験結果を示す。図40で提示される結果は二糖9392 3ngを移植1日前および移植後週1回皮下注射により投与すると、50%皮膚移植拒絶を起こるのが5日間遅延する。しかしながら、同二糖を300ng投与すれば、コントロール (PBS) に対して50%拒絶において顕著な相違を出すことができない。

図41は、二糖9392、グルコサミンまたは生理食塩水のいずれかを別々に投与した雌性マウス群におけるIDDM発症の減少を示す。

図41Aは、二糖9392、グルコサミン、または生理食塩水を別々に投与した雌性NODマウスの致死率を示す。図41および41Aの両

方において、雌性NODマウスは約3-1/2月齢であり、これは一群としてのマウスが既にIDDMの20%発症を許容していたことを意味することに留意すべきである。

図42は、物質H-9392投与なし (A1, A2, およびA3)、ならびに投与あり (B1, B2, およびB3) で、エアゾール化抗原でチャレンジされた6匹の免疫化ラットの呼吸困難 (RD) スコアを示す。

図43は、実施例6.23の合成経路によって調製される、4-O- (2-デオキシ-6-スルホ-2-スルホアミノ- $\alpha$ -D-グルコピラノシル) - (2-O-スルホ- $\beta$ -D-グルコピラノシド) ウロン酸の構造を示す。

#### 4. 発明の詳細な説明

本発明の一側面において、低分子量ヘパリン (LMWH) による治療は、T細胞およびマクロファージの活性TNF- $\alpha$  分泌能を阻害することが判明した。本

発明の別な側面において、実質的に精製された形態のカルボキシル化および／または硫酸化オリゴ糖を含む、 $\text{TNF-}\alpha$ 等のサイトカインの宿主中での生物学的活性を調節する手段を集合的に表す他の物質類が記述される。単純化のため、「物質（類）」または「活性物質（類）」という用語は、別途記載しないかぎり、ここに開示する治療法に使用されるLMWH、ならびに実質的に純粋な形でここに単離されたカルボキシル化および／または硫酸化オリゴ糖からなる物質、を指すものとする。

この効果の機能的発現の1つは、マウスおよびヒトにおける、遅延型過敏症反応の阻害に見ることができる。この反応は、マクロファージや他の炎症細胞を含む細胞によっても引き起こされうるT細胞依存性炎症反応である。活性 $\text{TNF-}\alpha$ の産生に影響を与える用量での活性物質による治療は、アジュバント関節炎（AA）と呼ばれる自己免疫関節炎のモデルを阻害することができた。活性物質による治療はまた、ラットの同種異系心臓移植における生存期間を延長し、NODマウスにおけるインスリン依存性糖尿病を除去した。さらに、同様の治療は、損傷した、または残留内皮下細胞外マトリックスの刺激に応答してのT細胞およびマクロファージによる活性 $\text{TNF-}\alpha$ 産生の誘導を防止した。 $\text{TNF-}\alpha$ 誘導の開始を信号で知らせること（およびその結果起こる炎症）に関与する上記の残留細胞外マトリックス（ECM）は、

酵素によって分解された細胞外マトリックス（DECM）と区別されるべきである。後者から選択された成分は本発明で単離されており、これらは $\text{TNF-}\alpha$ 活性を阻害または増幅することを示した。

血管損傷部位における $\text{TNF-}\alpha$ はアテローム性動脈硬化症の過程において恐らくある役割を果たすので、損傷した内皮下ECM部位における $\text{TNF-}\alpha$ 活性の阻害はアテローム性動脈硬化症の病理学的過程を改善するであろう。LMWH活性物質による治療の非常に驚くべき側面は、低用量で1週間間隔で投与した時にそのような治療が最も効果的になるということである。LMWH活性物質の高用量、または毎日の投与は、 $\text{TNF-}\alpha$ 分泌または免疫反応の阻害に効果がない。

ヘパリンの分画化または制御された解重合により調製された低分子量ヘパリンは、改善された抗血栓能力を示すが、またヘパリンに較べて異なる薬物速度論的特性を示す；半減期は2倍となり、また皮下注射後の抗凝血性効果に関して、バイオアベイラビリティはより高くなっている [Bratt, G. ら、Thrombosis and Haemostasis (1985) 53: 208; Bone, B. ら、Thrombosis Research (1987) 46: 845]。

本発明により、LMWH活性物質を抗凝血以下 (subanticoagulant) の用量で数日の間隔をおいて投与すると、活性TNF- $\alpha$ の誘導を伴う病理学的過程の予防および／または治療に有効であることが今回判明した。さらに、1～10糖単位、好ましくは2～4糖単位のオリゴ糖を含む、TNF- $\alpha$ の活性を阻害または増強しうる別個の物質が、同定されることが判明した。これら別

個の物質は、例えば生体の組織から、例えば基質細胞外マトリックスの溶解性分解産物から得ることができる。

#### 4. 1. 活性物質の供給源

本発明にしたがって使用すべきLMWHは、平均分子量が3000～6000のLMWH、例えば欧州特許EP 0014184に開示されているLMWH等、から誘導される。いくつかのLMWHは、例えばFragmin (登録商標)、Fraxiparin (登録商標)、Fraxiparine (登録商標)、Lovenox (登録商標) /Clexane (登録商標) 等の異なる商品名のもとで市販されている。

LMWHはいくつかの異なる方法で調製することができる。すなわち、エタノールによる分画化および／またはゲル濾過あるいは膜濾過等の分子ふるい分けによる標準的ヘパリンに存在するLMWHの富化、および制御された化学的 (亜硝酸、 $\beta$ -脱離または過ヨウ素酸酸化による) または酵素的 (ヘパリナーゼによる) 解重合である。解重合の条件は、所望分子量の産物を生じるように注意深く制御することが可能である。亜硝酸解重合が一般に使用されている。ヘパリンのベンジルエステルの $\beta$ -脱離による解重合もまた使用されており、これはヘパリナーゼを用いた酵素的解重合で生ずるのと同型の断片を生ずる。低い抗凝血活性を有し、基本的化学構造を保持しているLMWHは、過ヨウ素酸酸化を用いる解

重合によって、または別の方法で調製されたLMWHの抗トロンビン結合性フラクションを、吸着のために固定化抗トロンビンを用いて除去することによって調製することができる。

Fragmin (登録商標) は、ブタ腸粘膜由来のヘパリンナトリウム

を制御下で亜硝酸解重合して調製した、平均分子量が4000から6000ダルトンの範囲にある低分子量ヘパリンである。これはスウェーデン国Kabi Pharmacia社によってFragmin (登録商標) という名称のもとに、抗血栓剤として使用するため、2500IU/0.2mLおよび5000IU/0.2mL (それぞれ約16mgおよび32mgに相当) の一回用量注射器 (single dose syringe) に入れて注射用食塩溶液として製造されている。

Fraxiparin (登録商標) およびFraxiparine (登録商標) は、ブタ腸粘膜由来のヘパリンカルシウムをそれぞれ分画化または制御亜硝酸解重合により調製した、平均分子量が4500ダルトンのLMWHである。これらは、Sanofi (Choay Laboratories) によって、抗血栓剤として使用するため、一回用量約36mg (水0.3mLあたり3075IUに相当) として製造されている。

Lovenox (登録商標) (Enoxaparin/e) は、ブタ腸粘膜由来のヘパリンナトリウムを $\beta$ -脱離を用いて解重合して調製されるLMWH断片で、フランス国Pharmuka SFによって製造され、Rhone-Poulencによって、Clexane (登録商標) およびLovenox (登録商標) という名称のもとに、抗血栓剤として使用するため、20mg/0.2mL (水) および40mg/0.4mL (水) を含む一回用量注射器として販売されている。

本願に示されるように、ここに発見され記述されているLMWHの新規な特性は、使用したLMWHが、T細胞特異的抗原、マイトジェン、マクロファージ活性化物質、残留ECMまたはそのタンパク質成分 (フィブロネクチン、ラミニン、等) との接触による活性化に応答しての、休止T細胞および/またはマクロファ

ージによるin vitroでの活性TNF- $\alpha$ 分泌を阻害することが可能であれば、製

造方法、構造上の相違（解重合によってもたらされる、または原材料として使用したヘパリンの変動による）、または抗凝血活性に関係なくすべてのLMWHに共通である。

本発明の目的に効果的なLMWHを同定するための別の有用な試験は、種々の抗原〔例えば、破傷風抗原、ミエリン塩基性タンパク質（MBP）、精製タンパク質誘導体（PPD）およびオキサゾロン〕に対する実験的遅延型過敏症（DTH）皮膚反応（これはTリンパ球依存性である）の阻害である。LMWHはまた、ECMおよびそのタンパク質成分へのT細胞の接着を阻害する。

本発明により有効なLMWHは、医薬組成物に、例えばおそらく塩化ナトリウム、安定剤、および他の適切な非活性成分を含む水溶液として組み込まれる。好ましい投与方法は、皮下または静脈内への注射であるが、経口投与を含む他の適切な投与方法も本発明に包含される。

本発明によれば、LMWHは約5日～10日まで、好ましくは1週間の間隔を置いて投与すべきである。本発明の別な物質、とくにより分子量の低い（2000未満）オリゴ糖は、好都合で効果的な任意の方法（例えば、注射、経口、または局所投与）で毎日または週1回の投与を含む投与方法で投与することができる。

#### 4. 2. LMWH調製物の時間経過による活性喪失。添加された

##### 安定剤の効果

本発明者らが実施した時間経過試験は、Fragmin等のLMWH試料がそのTNF- $\alpha$ 活性阻害能を常温で72時間以内に、低温

（例えば4℃）では2～3カ月以内に失うことを示している。

後述の第6. 1節、表XIは、Fragmin（登録商標）の活性の約53%が、常温では1日後に失われることを示している。約2日後には、約87%の活性が失われ、約3日後には活性は全く見られなくなる。後述の第6. 2節、表XIIに示すように、実験はFragmin（登録商標）がより低い温度（4℃）でもその抗DTH反応性を失うことを示した。その過程は、ただ、より長い時間を要するだけである。対照的に、従来の非分画化ヘパリンは、その古典的な抗凝血活性を4℃では喪失しない。

開示されたLMWH調製物のサイトカイン阻害活性を安定させる、または保護することができる作用剤を発見しようとする努力において、発明者らは周知のヘパリン添加物に着目した。プロタミン硫酸は、ヘパリノイド (heparinoid) 分子の抗凝血効果を消すことが知られており、その目的のため臨床的に使用されている (GoodmanおよびGilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eighth Edition, Pergamon Press, New York, 1990, p.1317参照)。しかし、本発明によれば、添加されたプロタミン硫酸はLMWHのTNF- $\alpha$ 依存性活性の阻害を無効にしないことが判明した。事実、プロタミン硫酸は、実際にLMWHのこの活性を安定にするのである (後述の表XIIの、添加されたプロタミン硫酸を含有する記載を参照されたい)。

要約すると、(i) 希釈されたLMWH溶液は20℃で急速に活性を失い、4℃ではよりゆっくりと活性を失う (4℃におけるこの活性喪失は、ヘパリンまたはLMWHの標準的抗凝血および抗血栓活性の特徴ではないことに注意すべきである) ; (ii) ペパ

リンの標準的活性の古典的中和剤であるプロタミン硫酸は、本開示に記述されるLMWHのTNF- $\alpha$ に対する新規な活性を妨げない、と結論することができる。実に、本発明者らはプロタミン硫酸が実際にこの新規な活性を保護することを実証したのである。

#### 4. 3. LMWHの分画化および分解ECMまたは分解ヘパリンの調製。TNF- $\alpha$ 活性に対する明確に異なる促進および阻害活性の発見

先にすでに論じたように、低分子量ヘパリン (Fragmin) は、活性TNF- $\alpha$ の分泌を阻害する。最大阻害 $Inh_{max}$  (90%) は、1 pg/mLの濃度で観察された (図9参照)。対照的に、不活性化Fragminは、TNF- $\alpha$ 産生に関していかなる効果ももたなかった (図10参照)。しかし、Sephacrose 4B固体担体 (206nmにおける吸光度のプロットおよび対応するフラクション番号については図11参照) を用いた低圧サイズ排除ゲルクロマトグラフィー分離による不活性化物質の分画化は、阻害効果 (F-15) および促進効果 (F8、F2) をもつ活性フラクション



を示した（図11および表XII参照）。不活性化Fragminの阻害的フラクション（F-15）もまたDTH反応を阻害した〔活性Fragmin（登録商標）に関する図12；フラクションF15に関する図12A；フラクションF10に関する図12B参照〕。フラクションF10は、TNF- $\alpha$ 産生およびDTH反応に対し、何ら効果がなかった。

Sepharose 4Bによるサイズ排除ゲルクロマトグラフィー分離を、 $^{35}$ S-含有硫酸で標識したヘパラーゼ（heparanase）処理ECMより得た分解産物についても実施した。本発明では、いくつかの

タイプのヘパラーゼ酵素を用いた。これらの酵素には、MM5（ヒト胎盤由来の哺乳類ヘパラーゼ、Rad-Chemicals, Weizmann Industrial Park, Ness Ziona, Israelより商業的に入手した）、PC3 [Shoseiov, O.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. (1990) 169: 667-672に記述されている細菌性エンドグリコシダーゼ]、およびIBEX Technologies, Quebec, Canadaより入手した細菌源からの酵素が含まれた。放射能（CPM）のプロットおよび対応するフラクション番号を図13に示す。分画化したFragminおよび分画化したECM-ヘパラーゼの溶出プロファイルの上にスーパーインポーズするもう1つのプロットが、図14に示されている。上記のSepharose 4B低圧分離の条件は、下記の表Iに示されている。

表I. Sepharose 4Bクロマトグラフィー条件

カラム： Sepharose 4B (35cm x 0.7cm ID)

負荷量： 1~1.5mL

流速： 5mL/hr

溶媒： PBS (pH = 7.4)

フラクション： 0.2~0.5mL/試験管

検出器吸収設定： 206nm, 280nm

種々のフラクションを、TNF- $\alpha$ 産生に対する効果についてアッセイした。これらの結果は、下記の表XVに示してある。興味深いことに、2つの供給源由来の、類似の溶出特性を有するフラクション（例えば、Fragminおよびヘパラー

## ゼ分解ECM由来

のF-39およびF-42)が、類似した性質の生物学的効果をTNF- $\alpha$ 産生および/または活性に対して示すことが判明した。

図15および13は、Sephacrose 4Bカラムを使用して得た、LMWH (Fragmin)、および精製MM5ヘパラーゼによって調製し、 $^{35}\text{S}$ -硫酸で標識したECMのオリゴ糖、のそれぞれの溶出プロファイルの一例を示す。図13では、ECMの硫酸化ヘパラン (heparan) (ヘパラーゼの基質) がこの酵素によって分解され、分画化されたLMWHのそれに類似した溶出特性をもつヘパラン硫酸断片を生じることが見て取れる。

図16は、ECM+ヘパラーゼ“スープ”(すなわち、ECMのヘパラーゼ分解より得られた混合物)より得たオリゴ糖産物(Sephacrose 4Bフラクション#5、図13参照)が、活性TNF- $\alpha$ 分泌に対するその効果において、LMWHに実質的に類似した用量/応答特性をもつことを示している。すなわち、両者ともベル形状の用量/応答曲線を示し、また両者とも濃度1 pg/mLにおいて約90%の最大阻害を示して、これより低い、または高い濃度では活性が低下する。したがって、これらの活性物質の投与は、生理学的効果の容易に決定される「窓(window)」内に入る用量を含むことが有利である。

図17は、ECM分解産物の抗TNF- $\alpha$ 効果が、図13のピーク番号5の断片のサブフラクション(約5.65から約5.80の間)の領域で最大となることを示している。

したがって、ヘパラン硫酸は、ヘパラーゼによって働きかけられ、LMWHと同様にT細胞およびマクロファージに対して活性TNF- $\alpha$ の産生を止めること、そしてその結果TNFによっ

て仲介される炎症を止めることをフィードバックする分解産物を生成することができる。

また、無傷のヘパリンをエンドグリコシラーゼ (endoglycosylase) で処理して得た低分子量オリゴ糖断片は、TNF- $\alpha$ 活性に対して所望の調節効果を示し

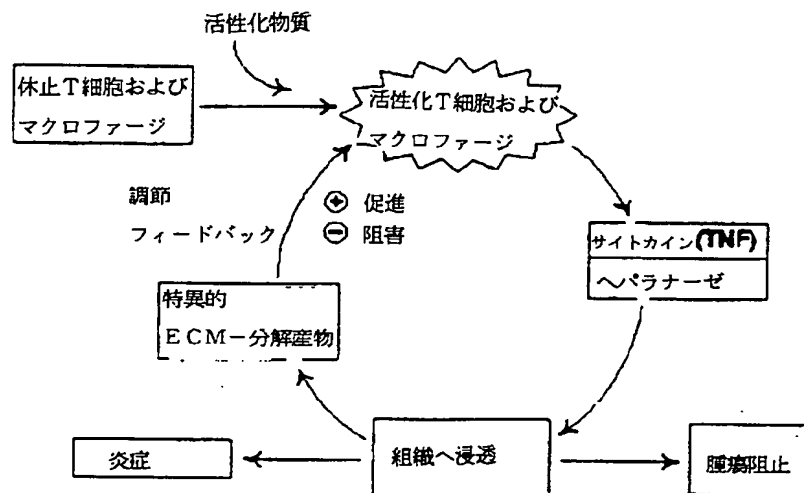
た。

#### 4. 4. LMWHフラクションおよびDECMならびにDHより

##### 得た断片のHPLC分離

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 技法を、LMWH (例えばFragmin)、ECM分解試料およびヘパリン分解試料由来のフラクションを一層良く分割するために使用した。最初に、2つのタイプのHPLC条件を使用した。第1組のHPLC条件下で、多数の個別フラクションを分離し、単離した。次に、活性TNF- $\alpha$ の分泌を調節するそれらフラクションの能力を調べた。本発明者らが非常に驚いたことには、他のフラクションがTNF- $\alpha$ 活性を阻害する一方で、選択されたフラクションは宿主中におけるTNF- $\alpha$ の活性を増大させることができる。次に、種々の成分をその分子量にしたがって一層良く分離するために、第2組のHPLC条件を使用した。

サイトカイン調節図



第1組のHPLC条件では、Guardcolumn Oligo (4cm x 6mm I.D.) を備えたT SK-GEL (登録商標) G-Oligo-PWカラム (30cm x 7.8mm I.D.) を使用した。これらの条件 (HPLC I) を、下記の表IIに示す。FragminおよびECM+MM5へパラーゼのHPLC Iによる分離の代表的クロマトグラムは、図18Aおよび18Bにそれぞれ図示されている。

表 I I. H P L C I クロマトグラフィー条件

カラム : TSK-GEL G-Oligo-PW 30cm x 7.8 mm ID  
ガードカラム : Guardcolumn Oligo 4cm x 6.0mm ID

ループ(loop) : 200  $\mu$  l

流速 : 0.5mL/min

溶媒 : 0.2 M リン酸緩衝液 (pH = 7.0)

フラクション : 0.5mL/ 試験管

検出器吸収設定 : 190nm - 400nm

第2組のHPLC条件 (HPLC II) は、下記の図IIIに示されており、これらはRice, K.G.らがAnalytical Biochem. (1985) 150: 325-331に記述したもの同様の条件を用いた。したがって、直列に連結した2つのカラムを使用した。すなわち、Toyo Soda TSK-Gel G3000SW (7.5mm x 50cm) カラムをG2000SW (7.5mm x 50cm) カラムに連結した。これらのカラム、およびG2000カラムの入り口末端に取り付けたガードカラムは、Phenomenexより入手した。さらに詳しい実験の詳細は、後述の第6. 11、6. 14および6. 15節に記述される。

表 I I I. HPLC II クロマトグラフィー条件

カラム : 直列に連結したToyo Soda TSK-Gel G3000SW (50cm x 7.5mm ID) および G2000SW (50cm x 7.5mm ID)

ガードカラム : Guardcolumn (10cm x 7.5mm ID)

ループ : 20 または 100  $\mu$  l

流速 : 1mL/min

溶媒 : 脱気 0.5 M NaCl

フラクション : 0.5mL/ 試験管

検出器吸収設定 : 205nm、232nm

これらの条件下では、小さい物質は大きい分子よりも長時間保持される。

さらにもう1組のHPLC条件 (HPLC III) では、選択された脱塩HPLCフラクションの純度を、強アニオン交換 (SAX) HPLCカラムの助けを借りて調べた。このようなSAX HPLCカラムは、同様にサイズ分けされた分子を、これらの分子中に

存在する負に荷電した基の数にしたがって分離することが知られている。物質中に負に荷電した基が多いほど、より長くカラムに保持される。HPLC III条件は、下記の表IVに要約してある。

表 I V. HPLC IIIクロマトグラフィー条件

カラム : SAX-HPLC カラム (25cm x 4.6mm ID, 粒径 5  $\mu$ m の Spherisorb を充填)

ループ : 1 mL

流速 : 1.5 mL/min

溶媒 : 線形勾配、下記

フラクション : 1 mL/試験管

検出器吸収設定 : 205nm、232nm

線形勾配 (第 6. 5 節参照)

当業者にとっては、ここに示す開示を考慮した後、他のHPLC条件も考慮可能であり、本発明の活性物質の分離に適用可能であることが明白であろう。特に、逆相条件もかなり有利に使用で

きる。例えば、前述のRice, K.G.らを参照されたい。

理論によって制限されることは望まないが、再度、TNF- $\alpha$ の活性は、活性TNF- $\alpha$ の細胞内産生を増加させることによって、宿主の免疫エフェクター細胞によって分泌される活性TNF- $\alpha$ の量を増加させることによって、またはサイトカインの活性をアゴニストの作用によって増強することによって、増強されるのではないかと推測される。

また、当然の帰結として、TNF- $\alpha$ の生物学的活性は、上記と反対の諸過程によって阻害されうる、ということになる。これらの過程には、TNF- $\alpha$ の受容体に対する活性な阻害物質（例えば、TNF- $\alpha$ のアンタゴニストとして作用する阻害物質、またはTNF- $\alpha$ のアンタゴニストとして作用する別の物質の産生を誘導する阻害物質）によってもたらされる競合ばかりでなく、TNF- $\alpha$ と

該阻害物資からなる、遊離のTNF- $\alpha$ より活性の低い複合体の形成も含まれる。または、TNF- $\alpha$ と増強的物質との「活気づけられた (souped-up)」複合体が、TNF- $\alpha$ の活性において観察された増加の原因であるかもしれない、ということになる。

#### 4. 5. 活性の測定

本発明の活性物質 (TNF- $\alpha$ 活性を阻害可能なものとTNF- $\alpha$ 活性を増強可能なものの両方がある) は、それらを含む混合物から単離され、精製された。ある場合には、これらの活性物質はここに記述する強力なHPLC技法によって実質的な均質性にまで精製された。

これら活性物質の純度をさらに示すものとして、種々の物質の特異的調節活性を測定した。

しかし、最初に、Carney, S.L.がProteoglycan Analysis, A Practical Approach, Chaplin, M.F. およびKennedy, J.F. (編) IRL Press, Oxford, Washington, D.C. (1986) p.129に開示していると同様の方法で実施したカルバゾールアッセイを利用して、与えられた試験試料中に存在するオリゴ糖物質の量 (例えば、存在する糖の量) を測定した。ピコグラム (pg) 量の糖が、この方法で定量できる。このアッセイは、後述の第5節で実施される。

次に、物質のその量と関連づけられる見掛け活性を、第5節に詳細に記述されている生物学的アッセイの1つにより測定し、用量/応答プロフィールを提供する。これらのバイオアッセイはin vitroで、またはin vivoの条件下で実施できる。

このようにして、TNF- $\alpha$ 活性の観察された阻害または増強は (これらは本発明の物質の不在下で観察されたTNF- $\alpha$ の活性の百分率として表されている)、このような物質の試験試料中における濃度または用量に依存することが判明した。もたらされる見掛け活性プロフィールは、おおむね図9および16に図示されているようなベル形状である。各物質について観察された阻害または増強パーセントの最大値は、それぞれ $Inh_{max}$ および $Aug_{max}$ と称される。

後にさらに述べるように、「理想的」単位用量 (すなわち、 $Inh_{max}$ または $Aug_{max}$ )

axに対応する用量)を確立するために使用されるバイオアッセイは、マウスにおけるTNF- $\alpha$ 活性またはDTHのin vitroまたはin vivo阻害または増強アッセイに基づいて行

うことができる。または、ヒト細胞に基づくin vitroアッセイ(後にさらに述べる)を使用することもできる。特異的調節活性または「R」値は、本明細書中の定義では、Inh<sub>ax</sub>またはAug<sub>ax</sub>と、その最大阻害または増強パーセントを引き起こす「理想的」用量との比である。In vitroアッセイのためには、「R」値は% $\times (\text{pg/ml})^{-1}$ の単位で典型的に表現される。

上記のように、比調節活性は、in vivo条件下でヒトまたはマウスにおける実験的DTH反応の阻害をモニターすることによっても確立することができる。活性TNF- $\alpha$ の分泌を阻害する阻害性組成物の特定用量の能力は、同一の組成物があるアッセイでは他のアッセイと比較して(すなわち、in vitroおよびin vivoバイオアッセイの間で)より強力になることもあるが、遅延型過敏症(DTH)反応を阻害するその能力と明確に相関していることが判明した。このin vivo細胞仲介による炎症性反応における阻害または増強活性は、極めて重要なものである。なぜなら、DTH反応は、自己免疫疾患、移植片拒絶反応、あるタイプの血管炎症およびアレルギーに関与する諸過程の表出だからである。したがって、この試験における活性は、後にさらに述べるように、これらのタイプの疾病および恐らく他の疾病における有用性を示すものである。

さらに、比調節活性という新規な量が、本明細書中ではInh<sub>ax</sub>またはAug<sub>ax</sub>値と、その最大パーセント値をもたらす物質の量または濃度(「理想的」用量)との比と定義されるが、この量は本発明の新規な活性物質を、公知の物質であるかもしれないが、当分野の技術ではここに開示するサイトカイン調節活性を有すると

認められていない物質から区別するのに役立つ。この特定の比を、本明細書では略して「R」値と称する。よって、本発明の新規物質または組成物は、最小「R」値によって記述することができ、この最小「R」値は見掛け活性対用量プ

ロフィールから計算できる。そしてこの「R」値は、本明細書の教示を参照することにより公知の組成物について求めることができる「R」値を超えるであろう。

。

#### 4. 6. 本発明によって恩恵を受けうる障害のタイプ

本発明に基づいて予防または治療可能な障害は、活性TNF- $\alpha$ 分泌の誘導を伴う病理学的過程と結びつくすべての障害である。これにはアテローム性動脈硬化症、アレルギー性血管炎、およびこれらに関連する病理学的過程；リウマチ性関節炎、タイプIの糖尿病（インシュリン依存性糖尿病またはIDDM）、多発性硬化症、エソテマトーデス、バセドウ病などの自己免疫疾患；アレルギー；移植拒絶反応；ブドウ膜炎、腸炎、などの急性および慢性の炎症；神経性食欲不振；敗血症による出血ショック、およびエイズにおけるHIV感染などが含まれる。エイズにおいては、本活性物質はHIVウイルスの複製を抑制し、これによってエイズ関連複合体（ARC）の発生を妨げる。サイトカイン活性の制御を意図した治療の恩恵を受けうる。その他の障害には、以下に限るものではないが、乾癬、天疱瘡、喘息、腎臓疾患、肝臓疾患、骨髄不全、白斑、脱毛症、筋炎などが含まれる。

さらに、活性TNF- $\alpha$ の増強は腫瘍、細菌感染およびウイルス感染の治療に有用である。薬理的に許容できる担体中の、活性TNF- $\alpha$ の産生を促進する本発明物質の、非経口的、経口的、または局所的な投与は、基底細胞癌、扁平上皮癌、またはメラノーマなどの皮膚癌との戦いをもまた助けるであろう。

本発明の活性物質の臨床的な適用においては、あるタイプの疾患の有効な治療は、多くの場合、ホメオスタシスの回復にあることを留意すべきである。内分泌の専門家にとっては、これは賢明な投与または特定のホルモンの拮抗作用を意味する。たとえば、インシュリン依存性糖尿病はインシュリン置換療法によって有効

に治療され、バセドウ氏病の患者にチロキシン遊離を阻害する薬理的な手段によって助けられうるであろう。もともとホルモンが欠損することのない疾患はホル



モンの投与によって症状が軽減することは稀にしかない。

抗腫瘍剤としてのTNF- $\alpha$ などのサイトカインの使用はそのような例の一つである。

癌患者への免疫調節剤の投与の根拠はきわめて乏しいかもしれない。TNF- $\alpha$ などの多くのサイトカインは治療目的を達するはるか以前に、投与量の限界だとわかる毒性を示す。そのような場合に、体内で産生されるTNF- $\alpha$ の活性の増強は、新しく、かつ従来試みられていた治療法のいずれよりも有効な結果を生むアプローチを提供するかもしれない。

明らかに、TNF- $\alpha$ の役割についての我々の理解は進行中であり、ホルモンおよびホルモン活性を制御する物質の新しく、役に立つ利用法が明らかにされなければならないことに疑いはない。特許請求の範囲にある化合物および医薬調製物のすべての使用は本発明の対象であることは言うまでもないが、疾病の症状を軽減し、発病を防止しまたは治療を提供するような使用形態もとくに考慮されている。

#### 4. 7. 本発明のオリゴ糖物質の局所的投与

本発明の物質は浮腫または炎症の治療用の調製物のような、局所的に投与される組成物にも用いられる。さらに、純粹に治療を目的とした用途に加え、本発明の物質は日焼け止めや日焼けローションなどの化粧品組成物の防護作用を補強するために用いることもできる。電磁波スペクトルの紫外領域に存在する有害な波長

(たとえば290-320nm)をすべて遮断できる完全に有効な製剤はほとんど存在しない。したがって、太陽に過度に身を曝すと日光紅斑として知られる急性の症状が生じ、長時間の、反復する被曝は、当然、皮のような外見の皮膚、さらには皮膚癌を招くことがある。

したがって、本発明の活性物質を化粧品調製物中に含ませることは、日光紅斑などの治療を要する状態の軽減とともに、皮膚の保護および保持の目的のためにとくに考慮されている。日やけ止めまたは日やけローション製剤中には、従来の日やけ止め剤とともに本発明のオリゴ糖の有効量を含ませることが望ましいであ

ろう。一般的に1 kgの対象物あたり約1  $\mu$ gから約100mg、より望ましくは約0.01 mgから約10mg、最も望ましくは0.1mgから1 mgの投与量の活性物質を含ませればよい。

化粧品組成物は、Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, Third Edition (1979), vol.7, pp.143-176. に述べられているように、当業者にはよく知られた従来の成分を含ませることができる。日やけ止め製剤において、本発明の活性物質の添加は最小紅斑用量 (minimum erythmal dose (MED)) を上昇させ、その結果、日やけ防止ファクター (SPF) を上昇させる。典型的な日やけ止め剤を含む特定の含有成分は上記Kirk-Othmer, pp.153-154に列挙されている。このほか、局所製剤および化粧品組成物は、米国特許4,199,576, 4,136,165, および4,248,861に述べられているように調製することができるが、完全な開示は文献中に含まれている。化粧品製造業の通常の技術に通じている者には、生ずる組成物が、以下に限るものではないが、溶液、ロー

ション、クリーム、ペースト、乳剤、スプレーまたはエアゾルなどを含む、さまざまな剤型をとりうることは、当然明らかであろう。

#### 4. 8. 典型的な投与処方

本発明によれば、TNF- $\alpha$ の阻害を起し、少なくとも50%のDTHの反応性の産生と阻害を起す1 kgあたりの最小のLMWHの投与量は、1 kgあたり12マウス阻害単位 (12u/kg) を形成することが確立された。マウスとヒトでは表面面積および代謝が異なっているので、ヒトではより少量のLMWHで処理されねばならず、マウスの12u/kgはヒトの1 u/kgに相当することが確立されている。たとえば、TNF- $\alpha$ の分泌およびDTHの反応性をともに阻害するのに有効なフラグミン (Fragmin®) バッチ38609の投与量は1週あたりの投与でマウスあたり5  $\mu$ gである。各マウスの体重はほぼ25 gなので12u/kgに相当するフラグミン

(Fragmin®) バッチ38609の投与量は1 kgのマウスあたり200  $\mu$ gである。したがって、ヒトにとって適当な1 u/kgの投与量は200  $\mu$ g/kg  $\div$  12 = 16.67  $\mu$ g/kgとなる。したがって体重70kgのヒトは、7日に一度、一回の皮下

投与あたり約1.2mgの投与量で処置することになる。ヒトは個人によって生物学的に異なっているので、最適投与量は約1.2mgからは異なり得、一般的には5mg以下、特に0.3から3mgの範囲内であろう。

したがって、マウスの投与処方ヒトのそれへの変換のおよその目安は次のようになる。

$$\text{ヒト投与量/kg} = \text{マウス投与量/kg} \div 10 \text{ または } 12$$

ラットに有効なLMWHの投与量は、ラット1kgあたりのLM

WHの投与量がマウス1kgあたりの投与量の2分の1、すなわち6u/kgであるから導きだされうる。たとえば、12uのフラグミ

ン (Fragmin®) バッチ38609 が  $200 \mu\text{g/kg}$  であれば、ラット

に適当な投与量6u/kgは週1回の $100 \mu\text{g/kg}$  または  $20 \mu\text{g}/200\text{g}$  をラットに投与すべきことになる。

LMWHから単離された、本発明のオリゴ糖物質の大部分は、ヘパリンを分解し、またECMを分解する。以下はin vivo DTHバイオアッセイから得られた、これらオリゴ糖物質のヒトの治療のための有効な投与量を予測する方法である。

図12Aはin vivoで単離した画分(F15)はマウスにおいてDTHを $0.1-5.0 \mu\text{g}/\text{マウス}/\text{週}$ の範囲で阻害する。我々の用いたマウス一匹の重量は25gmなので、in vivoの投与量はほぼ  $(0.1 \div 0.025\text{kg}) \quad 4-200 \mu\text{g/kgマウス}/\text{週}$  (in vitro  $0.01-10\text{pg/ml}$  と等価) である。

マウスとヒトとの表面積の差異を較正するためには、マウス投与量/kgを12で除する必要がある：

$$4-200 \mu\text{g/kgマウス} \rightarrow 0.33-16.67 \mu\text{g/kgヒト}。$$

したがって、体重70kgのヒトは約1.2mg (約 $1200 \mu\text{g}$ ) までの投与をうけるべきである。個人差に対応できることを確実にするためには、この投与量を血液凝固または血栓症に用いられるヘパリン類縁物質のいかなる投与量よりも低い量である5mgまで上げてよいであろう。したがって、体重70kgのヒトに対する投与量は

約5 mgまたはそれ以下、望ましくは約1.5 mgまたはそれ以下、最も望ましいのは約1 mgまたはそれ以下であろう。

実際、HPLCクロマトグラフィーによって得られたものを含

め、本発明の高度に精製された物質については、望ましい投与量はさらに低いであろう。たとえば、のちに詳細を述べる二糖は注射による投与で、マウス1 kgあたり約0.111  $\mu$ gから約0.5  $\mu$ gで阻害効果をあらわすことがわかった。したがって、ヒトへの投与量は、精製した二糖につき、ヒト1 kgあたり約0.0  $\mu$ gから0.05  $\mu$ g、または70kgのヒトあたり約0.7  $\mu$ gから約3.5  $\mu$ gであると見積られる。つまり、体重70kgのヒトに対する一般的な投与量の範囲はこの二糖につき、約0.1  $\mu$ gから約100  $\mu$ g、望ましくは約1  $\mu$ gから約10  $\mu$ gであろう。のちに述べる二糖「マーカー」についての投与量は若干高くなるかもしれない。

先に述べた投与量は個体の反応性によって一日多数回、あるいは1日1回、週1回、さらにはもっと長い間隔をおいて投与してもよい。しかし、LMWHについては先に述べたように、投与間隔は週1回が望ましい。

つぎに、以下の例に限定しないが、本発明について例示する。

#### 5. LMWH（フラグミン）のみを用いた実験

##### 5. 1. マウス脾臓細胞を用いた活性TNF- $\alpha$ 分泌の阻害のバイオアッセイ

LMWHの存在下または非存在下で培養した脾臓細胞の上清、またはin vivoでLMWHの処置を受けたマウスまたは受けなかったマウスの脾臓細胞を活性TNF- $\alpha$ を分泌する能力について解析した。TNF- $\alpha$ のバイオアッセイは、シクロヘキシイミド（CHI）で感作した細胞に対するTNF- $\alpha$ の細胞毒性効果に基づいており、そのニュートラルレッドとり込みアッセイによる

定量はWallach D., J. Immunol. (1984) 132: 2464-2469に述べられている。簡単に言えば、細胞上清に存在するTNF- $\alpha$ によるCHI-感作のHeLa細胞の殺害を測定した。上清中のTNF- $\alpha$ の濃度は外部から加えたTNF- $\alpha$ の滴定曲線と比較することによって決定した。細胞の生存はニュートラルレッドと二時間

インキュベートし、余剰の色素を洗った後、細胞によってとりこまれたニュートラルレッドをSorensonのクエン酸緩衝液-エタノール混液で抽出し、マイクロエライザ自動リーダー (Microelisa Autoreader) を用いて570nmで比色定量を行った。

LMWHによって処理されたマウスの細胞は以下のようにして得た：グループあたり少なくとも5匹のBALB/c株の雌のマウス（体重25g、生後2か月）に、通常マウスあたり0.5から20 $\mu$ gの範囲の、さまざまな量のLMWHを皮下注射した。5日後マウスを頸部脱臼 (Cervical dislocation) によって殺し、脾臓をとりだし、赤血球を除去した脾臓細胞について、残留細胞外マトリックス (ECM)、コンカナバリンA (Con A) またはリポ多糖 (LPS) による誘導に反応したTNF- $\alpha$ の産生を検定した。

#### 5. 2. 実験的DTH反応性の阻害のin vivoバイオアッセイ

同系BALB/cマウスグループ (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) または異系CD1マウスグループ (Weizmann Institute Animal Breeding Center, Rehovot, Israel) の剃毛した腹部へのアセトン/オリーブ油 (4/1, v/v) に溶かした2%のオキサゾロン (OX) 100 $\mu$ lを局所的に塗布によって感作した。DTH感受性は5日後以下のように誘発させた：マウスはアセトン

／オリーブ油に溶かした20 $\mu$ lの0.5% OX（耳の両側にそれぞれ10 $\mu$ lずつ）によってチャレンジをうけた、耳の定められた領域をチャレンジ直前およびチャレンジ後24時間、および48時間にMitutoyo技術者用マイクロメーターによって測定した。個々の測定する耳の膨脹は、マウスグループの同一性に対し盲検的である。耳の膨脹の増分は用いられたマイクロメーターによって10<sup>-2</sup>mmまたは10<sup>-4</sup>インチ (+SE) の単位で平均として表した。パーセント阻害は次のように計算した。

$$\% \text{ 阻害} = 1 - \left[ \frac{\text{被処理-負のコントロール}}{\text{正のコントロール-負のコントロール}} \right]$$

マウスは例5.1のようにLMWHにより処理をうけ、OXによる第一次感作の一日前に注射をうけた。OX感作の5日後、マウスは上に述べたようなDTH反応の誘導のためのチャレンジを受けた。

正のコントロールはLMWHによる処理を行わない免疫したマウスにおいて誘発されたDTH反応である。負のコントロールは元のままの（免疫されていない）マウスにおける抗原によって生ずるバックグラウンド膨脹である。

### 5. 3. *in vitro*におけるT細胞およびマクロファージによるTN

#### F- $\alpha$ 分泌の誘導

マイクロタイタープレートは以下のように調製した：フィブロネクチン（FN）またはラミニン（LN）（Sigma）を平底の96ウェルプレート（Costar）にウェル当たり  $1\mu\text{g}/50\mu\text{l}$  PBS の濃度で加え、16時間後に除去した。残りの結合サイトはBSA/PBS（ $10\text{mg}/\text{ml}$ ）を二時間ウェルに加えることによりブロックし

、洗って除去した。

ECM-コートウェルは以下のようにして調製した：ウシ角膜内皮細胞を平底の96ウェルプレートで培養した。内皮細胞のコンフルエントな層を溶かし細胞残渣のない無傷のECMを得た（Gospodarowicz, D. et al., J. Biol. Chem. (1978) 253: 3736）。破碎した、または残留ECM（RECM）はECMを27Gの注射針で温和に3回搔きとることによって調製し、次いで露出したサイトはBSA/PBSによってコートした。K1と名づけられた、ミエリン塩基性タンパク（MBP）を認識する、残りのクローン化されたラットCD4<sup>+</sup>T細胞は培養により増殖、維持し、プレートのウェルに1%BSAおよび抗生物質を添加したウェルあたり  $100\mu\text{l}$  のRPMI 1640（Gibco）中に、同系の脾臓マクロファージ  $3 \times 10^5$  の共存または非共存下、ウェルあたり  $10^5$  細胞を加えた。

脾臓マクロファージは特異的なモノクローナル抗体（mAb）を用いてTおよびB細胞を除去することによって精製した。抗ネズミTNF- $\alpha$  mAbはGenzyme（Cambridge, MA）より購入し、300倍に希釈した。この希釈液を  $10\mu\text{l}$  ずつ分取し各ウェルに加えた。必要に応じてMBP（ $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、ConA（ $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、LPS（ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、FN（ $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、およびLN（ $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）をウェルに加えた。

プレートを湿式インキュベーター中で37℃ 3時間インキュベートした。ひきつ

づいてウェルの内容物（1実験グループあたり4ウェル）を集め、遠心し、5.

1. 節の例で述べたように、培地を活性TNF- $\alpha$ の分泌に対しアッセイした。

即ち、培養したマクロ

ファージおよびリンパ球の上清をTNF- $\alpha$ による殺害に感受性のあるHeLa細胞の培養に添加し、これら細胞の検査用培地の存在下における死滅を、外部から加えたTNF- $\alpha$ に対する滴定曲線と比較して検量した。細胞の死滅は、前培養したHeLa細胞からの色素ニュートラルレッドの遊離によって調べた。ここに示された結果は、基本的に類似の結果を産んだ6つの実験から得られたものである。

表Vは、マクロファージの存在下で培養されたT細胞は、特異的な抗原MBP（グループ4）、分裂促進因子ConA（グループ6）またはLPS（グループ8）との接触によって誘導されTNF- $\alpha$ を分泌しうることを示す。しかし、抗体または分裂促進因子の刺激なしでも、残留細胞外マトリックス（RECM；グループ10）またはECM成分フィブロネクチン（FN；グループ12）またはラミニン（LN；グループ14）によっても誘導を受ける。無傷のECMはTNF- $\alpha$ の弱い誘導因子であった（グループ16）。

表 V. T細胞およびマクロファージによる  $\text{TNF-}\alpha$  の分泌は特異的抗体 MBP、Con A、LPS、RECM、または ECM 成分によって誘導される。

グループ	$\text{TNF-}\alpha$ 誘導因子	マクロファージの存在下(yes) または非存在下(no)で 培養された K1 細胞	分泌 $\text{TNF-}\alpha$ (pg/ml)
1	無添加	no	50
2		yes	65
3	MBP 抗原	no	30
4		yes	950
5	Con A	no	120
6		yes	1300
7	LPS	no	50
8		yes	1500
9	RECM	no	30
10		yes	900
11	FN	no	20
12		yes	650
13	LN	no	50
14		yes	500
15	ECM	no	30
16		yes	120

#### 5. 4. LMWHによる $\text{TNF-}\alpha$ 分泌の調節

T細胞および付随細胞の培養は5. 3. 節に述べたように行なった。LMWHは細胞培養の開始時にウェルに添加した。 $\text{TNF-}\alpha$ のレベルは培養3時間後に測定した。

表 VI は *in vitro* で LMWH (Fragmin® バッチ 38609) 存在すれ

ば、特異的抗体 (MBP ; グループ 4)、分裂促進因子 (Con A お

よび LPS ; グループ 6 および 8)、RECM または ECM 成分 (グループ 10, 12 および 14) によって誘導される活性  $\text{TNF-}\alpha$  の分泌を阻害することを示す。RECM によって誘導される  $\text{TNF-}\alpha$  分泌はアテローム性動脈硬化症に伴う可



能性が大きいので、LMWHによるTNF- $\alpha$ の阻害はアテローム性動脈硬化症への対応に有益であろう。

表VI. in vitroで誘導されるTNF- $\alpha$ 分泌の誘導はLMWH (Fragmin® バッチ 38609) によって阻害される。

グループ	TNF- $\alpha$ 誘導因子	LMWH (1 $\mu$ g / ml)	T細胞及びマクロファージ によるTNF- $\alpha$ の 分泌 (pg/ml)
1	無添加	none	65
2		yes	30
3	MBP抗原	none	950
4		yes	60
5	Con A	none	1300
6		yes	80
7	LPS	none	1500
8		yes	80
9	RECM	none	900
10		yes	90
11	FN	none	650
12		yes	90
13	LN	none	500
14		none	70

#### 5. 5. LMWH-処理BALB/cマウスを用いたEx Vivo実験

in vivoでマウスに投与したLMWHのTNF- $\alpha$ の分泌に対

する効果を脾臓細胞を用いてin vitroで試験するために以下の実験を行った。各グループあたり5匹ずつのBALB/cマウスを

生理食塩水で希釈したさまざまな投与量のLMWH (Fragmin® バッチ38609) の皮下注射による処理を行った。一週間後、マウスを殺し、赤血球を含まない脾臓細胞について、RECMを含まないコントロールウェル (A) またはRECMでコートされたウェル (B) に反応してTNF- $\alpha$ を分泌する能力を調べた。TNF- $\alpha$ の分泌のレベルの測定は5. 1節に述べられたように行った。表VIIは7日前に行った5  $\mu$ gのLMWHの一回の注射がRECMによって誘導されるTNF- $\alpha$ の分泌を阻害することを示す。LMWHの投与量をこれよ

り上げても下げても効力は低下する。つまり、最適量のLMWHの一週間前のin vitro投与が有効である。

表Ⅶ. 残留ECMに反応したT細胞媒介のTNF- $\alpha$ 分泌への  
Ex vivo 阻害。

BALB/cマウスの LMWH処理 (週1回)		in vitro TNF- $\alpha$ 分泌(pg/ml) のための脾臓細胞の培養条件	
		A. 無添加	B. 残留ECM(%阻害)
1	無処理	30	400
2	0.5 $\mu$ g	50	380 (5)
3	1 $\mu$ g	25	90 (78)
4	5 $\mu$ g	25	60 (85)
5	10 $\mu$ g	30	140 (65)
6	20 $\mu$ g	40	320 (20)

表Ⅷは5  $\mu$ g のLMWH Fragmin® バッチ 38609のin vivo 投

与もまたLPSによって誘導されるTNF- $\alpha$ の分泌の阻害に有効であることを示す。BALB/c (一実験グループあたり4匹) に対し、生理食塩水に希釈した指示量のLMWHで処理した。一週間後、10mgのLPSをマウスの腹腔に注射し、4時間後に殺して赤血球を除去した脾臓細胞を得、これを湿式インキュベーター中でRECMでコートしたプレートのウェルで3時間培養した。RECMに反応して分泌されたTNF- $\alpha$ レベルは培養の上清を用いて測定された。結果は表Ⅷに示す。

表Ⅷ. マウスのLMWHによる処理はLPS媒介のマクロファージによる活性TNF- $\alpha$ の分泌を阻害する。

マウスの LMWH処理 ( $\mu$ g)	LPSに反応したマクロ ファージによる in vitro の TNF- $\alpha$ の分泌 (pg/ml)	%阻害
0	690	--
0.1	500	28
1	350	50
5	120	82
20	550	20

#### 5. 6. 起源の異なるLMWHを用いた実験

活性TNF- $\alpha$ の分泌の阻害およびDTHの応答に対する、異なるLMWHの効果を調べるために、異なる濃度の指示されたLMWHによってマウスの皮下注射処理を行った。一週間後、マウスの一部を殺し、in vitroにおけるCon A活性化に応答した活性TNF- $\alpha$ の分泌の誘導を測定した(表IX)。残ったマウスにつ

いて抗原、オキサゾロンへの応答能力を調べた(表X)。結果は表中にLMWHで処理されなかったマウスの応答を対照として%阻害で表わした。

表IXおよび表Xの結果を検討することによって二つの結論が下されうる。

1. それぞれが類似の抗血栓効果を持つことについて検定された(ファクターXアッセイ)、LMWHの異なるバッチは、それぞれ活性TNF- $\alpha$ の分泌の阻害に対して異なる最適投与量をもつ

。さらに、クレキサン(Clexane®)バッチ4096のように、調べた限りの濃度では活性TNF- $\alpha$ の分泌に対し何ら阻害効果をもたないLMWH製剤も存在した。したがって、LMWH製剤の抗血栓効果は、LMWH製剤の活性TNF- $\alpha$ の分泌を阻害する能力と関係しているのではないことが結論されるであろう。二つの異なるバイオアッセイの結果は製剤中に存在する異なるファクターによって生じている。

2. 活性TNF- $\alpha$ の分泌を阻害する、特定の投与量のLMWHの能力は、DT

H反応を阻害する能力と関係しており、活性TNF- $\alpha$ の分泌を阻害する最適なLMWH製剤の投与量は、同時にDTH反応の阻害にとっても最適である。

表IX. 異なるLMWHによる週1回のマウスの処理はマウスのDTH感受性を阻害する。

LMWH のバッチ	DTHの投与量 ( $\mu$ g/gm マウス)	DTHの投与量 応答 ( $10^{-2}$ mm)	阻害 (%)	"R" 値 $\% \times (\mu\text{g/gm})^{-1}$
フラクシオン バッチ 38609	無添加	25	(+) コントロール	-
		2	(-) コントロール	-
	0.02	21	12	-
	0.04	23	10	-
	0.2	6	73 (max)	365
	0.4	6	20	-
	2	0	0	-
バッチ 45389	無添加	28	(+) コントロール	-
		2	(-) コントロール	-
	0.004	26	6	-
	0.04	4	89 (max)	2225
	0.2	24	13	-
	0.4	26	6	-
	2	29	0	-
クレキサソ バッチ 2088	無添加	22	(+) コントロール	-
		2	(-) コントロール	-
	0.004	17	23	-
	0.04	3	87 (max)	2175
	0.2	13	41	-
	0.4	23	0	-
バッチ 2066	無添加	23	(+) コントロール	-
		2	(-) コントロール	-
	0.004	20	13	-
	0.04	8	66	-
	0.2	7	70 (max)	350
	0.4	7	70	-
バッチ 4096	無添加	24	(+) コントロール	-
		2	(-) コントロール	-
	0.04	27	効果 なし	0
	0.2	26	"	0
	0.4	24	"	0

表 X. 異なる LMWH による週 1 回のマウスの処理はマウス脾臓  
細胞を用いた Ex Vivo の活性 TNF の遊離を阻害する。

LMWH のバッチ	投与量 ( $\mu$ g/gm マウス)	Con A-誘導 TNF 分泌 (pg/ml)	阻害 (%)	“R” 値 % $\times$ ( $\mu$ g/gm)
フラクシオン				
バッチ 38609	無添加	450	コントロール	-
	0.02	425	5	-
	0.04	400	12	-
	0.2	68	85 (max)	425
	0.4	350	22	-
	2	435	8	-
バッチ 45389	無添加	320	対照	-
	0.004	280	13	-
	0.04	70	78 (max)	1950
	0.2	260	18	-
	0.4	290	10	-
	2	310	4	-
クレキサソ				
バッチ 2088	無添加	400	コントロール	-
	0.004	360	10	-
	0.04	64	84 (max)	2100
	0.2	152	38	-
	0.4	380	4	-
バッチ 2066	無添加	350	コントロール	-
	0.004	338	6	-
	0.04	185	54	-
	0.2	192	57 (max)	285
	0.4	186	55	-
バッチ 4096	無添加	320	コントロール	-
	0.04	335	効果なし	0
	0.2	325	“	0
	0.4	330	“	0

#### 5. 7. 低投与量の LMWH によるラットにおけるアジュバント

##### 関節炎 (AA) の治療

アジュバント関節炎はある系統のネズミについて、これを *Mycobacterium tuberculosis* の抗原によって免疫したときに誘導される実験的な疾患である (Pearson, C.M. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1956) 91: 91)。この実験的疾患はヒトのリウマチ性関節炎のモデルとなると考えられている (Pearson, C.M., Arthritis. Rheum. (1964) 7: 80)。この関節炎は、関節組織の構造と交差反応を

行う *M. tuberculosis* の抗原を認識する T リンパ球によって引き起こされるものとみられる (Cohen, I.R. et al., *Arthritis. Rheum.* (1985) 28:841)。

油に溶かした *M. tuberculosis* (1 mg) で Lewis ラットを免疫し、アジュバント関節炎を誘導した (Pearson, C.M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1956) 91:91)。5 日後、LMWH および/またはヘパリンの一定量を用いて指示に従ってラットに皮下接種し、記述された方法 (Holoshitz, J. et. al., *Science* (1983) 219:56) に従って関節炎の成長を 0-16 の尺度を用いて記録した。

すべての実験は Fragmin®, Batch 38609 を用いて行われた。

Fragmin® に対する投与量応答を知るために (図 1)、AA を誘導するために免疫されたラットに、注射後 5 日目を起点として  $0.5 \mu\text{g}$  (○)、 $1 \mu\text{g}$  (◆)、 $2 \mu\text{g}$  (●)、 $10 \mu\text{g}$  (◇)、 $15 \mu\text{g}$  (△)、 $20 \mu\text{g}$  (202■)、 $30 \mu\text{g}$  (▲)、 $40 \mu\text{g}$  (×) および PBS コントロール (□) の皮下注射を週 1 回行った、 $20 \mu\text{g}$  の投与量が関節炎の阻止に最も有効であった。

AA の推移に対する  $20 \mu\text{g}$  の投与量の Fragmin® の効果を図

2 に示した: PBS コントロール (□)、5 日後の 1 回の処置のみ (▲)、1 日 1 回 (●)、5 日毎 (○)、週 1 回 (■)。5

日間隔および 7 日間隔の Fragmin® の投与がともに関節炎を阻止

したことが示される。

図 3 は Fragmin® (バッチ 38609) の週 1 回の投与を、AA に

対する標準のヘパリンの作用と比較したものである。AA を誘導するために Lewis ラットを免疫した。5 日目を起点として、一週間間隔で  $20 \mu\text{g}$  投与量の Fragmin® (●)、ヘパリン (○) また

は対照のリン酸緩衝食塩水 (PBS) (□) の皮下接種をラットに

対して行った。結果は Fragmin® とヘパリンに極めて大きな違い

があることを示している。即ち、Fragminは完全に関節炎を抑えたが、ヘパリンに阻止効果がみられなかった。

図4に示されるように (Fragmin® (バッチ 38609)(●)、ヘ

パリン (○)、PBSコントロール (□)) 驚くべきことに毎日

の投与ではヘパリンによる阻止効果は Fragmin® のそれよりも強

かったが、毎日  $20\mu\text{g}$  の投与量の LMWH の投与は AA に対して阻止効果を示さなかった。

AA を誘導するために免疫した Lewis ラットに対して投与した、他の数種の LMWH についても類似の阻害効果がみられた。図5

は  $20\mu\text{g}$  投与量の Fraxiparin® (1日1回 (□) ; 週1回 (■))

)、Fraxiparine® (1日1回 (△)、週1回 (▲) ; Lovenox

® / Clexane ® (1日1回 (●) ; 週1回 (○))、PBS コ

ントロール (×) の注射の結果を示す。異なったタイプと起源の3種のすべての LMWH は、毎日ではなく週1回に投与した際に関節炎に対し顕著な阻止効果を示した。

5. 8. LMWH による処理は同種異系移植拒絶反応を防止する

Wister ラットに対し同種異系の BN 心臓を移植した (Ono, K.

and Lindsay, E.S., J. Thorac. cardiovasc. surg. (1969) 45: 225-229)。移

植の前日から、ラットに  $20\mu\text{g}$  の投与量の Fragmin

® または PBS コントロール (図6、それぞれ●および○) を7

日間隔で皮下注射し、生存を記録した。腹部の触診によって検定した移植した心臓の搏動の停止した日を、移植拒否の日とした。図6は LMWH の週1回の投

与は同種異系間心臓移植の生存率を著しく高めたことを示す。

#### 5. 9. NODマウスのインシュリン依存性糖尿病 (IDDM) に

##### 対する LMWH の生物学的影響

マウス NOD 株は自然にタイプ I のインシュリン依存性糖尿病 (IDDM) を発症し、これはヒト IDDM のモデルとして受け入れられている (Castano, L. and Eisenbarth, G.S., *Ann. Rev. Immunol.* (1990) 8: 647-679)。この疾患は生後 4-5 週で膵小島の炎症、インスリン炎を発症させる。このインスリン炎は、 $\text{TNF-}\alpha$  による障害に感受性のある、インシュリン産生のベータ細胞に進行的に損傷を与える。生後 4-5 か月で、ベータ細胞の破壊が十分進み、糖尿病の症状が明らかとなる。

LMWH による処理が IDDM の進行に影響を与えるかどうかを試すために、10 匹の雌の NOD マウスのグループに対し、マウスあたり  $5 \mu\text{g}$  の Fragmin® (バッチ 38609) の皮下注射を週 1

回行った。この投与量は  $\text{kg}$  あたり 12 マウス単位に相当する。10 匹のコントロールマウスに対し、生理食塩水による注射を行った。生後 5 か月に達したとき、全てのマウスから採血し、標準の方法 (Elias, D., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1990) 87: 1576-1580) を用いて IDDM の発生を決定した。図 7 は

コントロールマウス (“none”) が異常な血中グルコース量 ( $400\text{mg/dl}$ ) をもつことを示している。これとは対照的に、LMWH で処理したマウスの血中グルコース量 ( $100\text{mg/dl}$ ) は正常だった。したがって、たしかに LMWH による処理は IDDM の進行に対して治療効果がある。

#### 5. 10. アレルギーの LMWH による治療

多くのアレルギー患者において、特定の抗原または抗 IgE の皮内挑戦は、直ちに膨疹および発赤拡張を誘発し、これにひき続いて 4-8 時間後に、後期皮膚反応と呼ばれる一貫した膨化の進行と、白血球の浸潤が生じる。後期反応 (LPR)<sup>2</sup> ははじめて皮膚について記述された (Solley, G.O. et al., *J. Clin. Inve*



st. (1976) 58 : 408-420)。しかしながら、今日では、とりわけblood-borne白血球の反応領域の浸潤を含むI g E依存の反応の後期の結果は呼吸器官、その他の解剖学的部位にも生ずることが明らかとなっている (Lamanski, R.F. and Kalliner, M., in Allergy: Principles and Practice, vol.1 (1988) Middleton, Jr., E. et al. (Eds.), pp. 224-246)。もちろん、I g E依存の反応の多くの臨床的に重要な結果は、皮膚および呼吸系の双方において、抗原に曝された後の初期に遊離されるメディエーターの直接の影響というよりは、L P Rの期間にこれらの部位に動員される白血球の作用を反映するというもっともな議論がある (Kay, A.B., J. Allergy. Clin. Immunol. (1991) 87 : 893-910)。

最近では、喘息、アトピー性皮膚炎などの慢性アレルギー疾患は、浸潤および主として好酸球やT細胞の活性化を含む背景となる炎症のプロセスの結果であるということは広く認識されている

(Kay, A.B., J. Allergy. Clin. Immunol. (1991) 87 : 893-910)。

いくつかの方面からの証拠は、L P Rと結びついた白血球の浸潤はマスト細胞の脱顆粒の結果生ずるという仮説を支持している。ヒトおよび実験動物の双方において、I g E依存またはその他のある種の機構によって、皮膚のマスト細胞脱顆粒を誘発する物質はまた反応部位への白血球の浸潤を促進させることができる (Sollay, G.O. et al., J. Clin. Invest. (1976) 58 : 408-420; Lamanski, R. F. and Kalliner, M., in Allergy: Principles and Practice, Vol.1 (1988), Middleton, Jr. E. et al. (Eds.), pp. 224-246; Kay, A.B. J. Allergy Clin. Immunol. (1991) 87 : 893-910)。活性化されたマスト細胞でつくり出されうるメディエーターについての総説は、いくつかのペプチドまたはタンパク性の走化性因子とともに、LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, PGD<sub>2</sub>およびPAF (血小板活性化因子) などの脂質メディエーターを含め、多くが、L P Rにおける白血球の浸潤に貢献しているらしいことを明らかにしている (Holgate, S.T. et al., in Allergy: Principles and Practices, Vol.1 (1988), Middleton, Jr. E. et al. (Eds.), pp. 135-178)。ペプチドまたはタンパク性の物質は、その範囲にテトラペプチドの“アナフィラキシーの好酸球走化性因子”から、きわめて高分子

量の“好中球走化性因子”までさまざまな大きさのものが含まれる。最近、 $\text{INF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-1\alpha$ および小さな分泌ペプチドの $\text{MIP}-1$ 遺伝子ファミリーの4つのメンバーなどと類似または同一のサイトカインを含む、より多くのマスト細胞と結びついた白血球浸潤のメディエーターが同定されてきた (Gordon, J.R. et al., Immunol. Today (1990)

11: 458-464)。これらサイトカインの4つ ( $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-1\alpha$ 、 $\text{MIP}-1\alpha$ および $\text{MIP}-1\beta$ ) は、白血球浸潤を促進する能力をもつことが明らかにされた。

ごく最近、Wershil, B.K. らは、J. Clin. Invest. (1991) 87: 446-453において、マスト細胞欠損マウスを用い、 $\text{IgE}$ 依存の $\text{LPR}$ の間に生ずる白血球の漸増強はマスト細胞依存性であること、ならびにこの阻害は抗 $\text{TNF}-\alpha$ の抗血清の局所投与によって部分的に遮断されることを明らかにした。今日、 $\text{IgE}$ 依存の $\text{LPR}$ と結びついた細胞の浸潤/活性化の阻害は、さまざまなアレルギー疾患の症状を軽減させる治療法の決め手であることは広く認められている (Barnes, P.J., N. Eng. J. Med. (1989) 321: 1517-1527)。

本発明の出願人にとって予想外であったが、 $\text{LMWH}$ が外的作用による皮膚アナフィラキシー ( $\text{PCA}$ ) を発症しているマウスにおける、 $\text{IgE}$ 依存の $\text{LPR}$ の期間の白血球の浸潤を著しく阻害することがわかった。

マウスに対し、モノクローナル $\text{IgE}$ 抗 $\text{DNPA b}$  ( $\sim 20\text{ng}$ ) を両耳に*i.d.* (皮内) 注射した。一日後、このマウスに生理食塩水にとかした $\text{DNP}_{30-40}-\text{HSA}$ を*i.v.* (静脈) 注射した。 $\text{DNP}-\text{HSA}$ チャレンジ前とチャレンジ後さまざまな時間間隔をおいて、マイクロメーターを用いて耳の厚さを測定することによって、耳の膨化を検査した。すべての実験において、 $\text{PCA}$ 反応の部位の組織は、頸部の脱臼で殺したのちに得、これよりギムザ染色の切片を得た。 $\text{LMWH}$ は-2日目に一回の*S.C.* (皮下) 注射 ( $5\mu\text{g}$ /マウス) によって与えられた。

## 結果

膨化は $\text{PCA}$ 反応の部位に直ちに発達した ( $\Delta$ は15分で $35 \times 10^{-4}$ インチ) が、

コントロール部位（希釈剤のみの注射をうけた耳）では膨化が生じなかった。PCA部位の膨化はi.v.（静脈）抗原チャレンジを受けてから2時間から4時間の間に急速に減退した。

i.v.抗原チャレンジ6-8時間後に、PCA及びコントロール部位の組織学的な検査を行った。PCA部位のマスト細胞の大多数は顕著なまたは中程度の顆粒減少をみせた。これとは対照的に、コントロール部位のマスト細胞で著しい顆粒減少をみせたのは5%以下であった。抗原チャレンジ6時間後PCA部位にのみははっきりと好中球の浸潤がみられた。この浸潤は二日前にLMWHの前処理を受けたマウスでは大幅な（60%の）減少をみせた。マスト細胞の顆粒減少の程度に対して、この薬剤は何の影響も与えなかった。この動物の末梢血液中の全または特質的な白血球数に対するこの薬物の効果はなかった。LMWHヘパリンはIgE依存の後期皮膚反応と関連した細胞浸潤を阻害すると結論することができる。これに加え、出願人はさらに、LMWHの投与は活発な皮膚アナフィラキシー（IgEの特異的な産生はDNP-HSA Alumによって誘導されるであろう）をもつ動物における、皮膚LPRに対して有益な効果を表すことを予想している。肝のアレルギー性炎症に対する同様の効果も予想される（Tarayre, J.P. et al. Int. J. Immunopharmacol. (1992) 14 (5) : 847-855）。

#### 5. 11. ヒトDTHのLMWH処理

図8は体重85kgの40歳の男性ボランティアの破傷風菌抗原に対

するDTH反応性（Merieux皮膚アプリーケーター）の試験を行った実験を示す。24時間および48時間に約18mmの硬結が測定された

。このボランティアは次いで3mgのFragmin®（バッチ 38609）

の皮下注射処理を受けた。5日後ボランティアは再び破傷風菌に対するDTH反応性の検査をうけたが、硬結は約5mmにまで阻止された。ボランティアは3週後にふたたびテストを受け（“回復”）、テスト結果は陽性の反応性を示した（24時間および48時間に23

mmの硬結)。このボランティアは再び前回と同様にFragmin®の

処理を受け、7日後に(“7day post”)再びDTH反応性の測定を受けた。DTHは再び硬結約5mmにまで阻害された。DTHの回復は再び3週間後に見られた。このように、5mg以下の投与量のLMWHはヒトにおいて5および7日間隔の処理によってDTHを阻害することができる。

## 6. LMWH (フラグミン) およびその他の活性物質を使用する実験

### 6. 1. LMWH (フラグミン) TNF- $\alpha$ 抑制活性の安定性の研究

フラグミンバッチ38609を通常生理食塩溶液中で $5\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ の濃度まで希釈した。バイアルの幾つかを等量のプロタミンスルフェート( $5\mu\text{g}$ )と混合し、バイアルを0~72時間にわたって室温(21℃)で貯蔵し(表XI)、または4℃で1~4ヶ月貯蔵した(表XII)。次にプロタミンスルフェートと共に、またはそれを使用しないでフラグミンをin vivoで使用して上記のようにしてBALB/cマウスでDTH T細胞反応を抑制した。本実験につき、陽性対照DTHは $17.5 \pm 1.2 \times 10^{-2}\text{mm}$ (0%抑制)であり、また完全抑制DTHは $2.6 \pm 0.5 \times 10^{-2}\text{mm}$ (100%抑制)であった。

20℃におけるLMWHのインキュベーションの結果が表XIにリストされる。LMWHは周囲温度で72時間にわたるインキュベーション後にTNF- $\alpha$ -依存性のT細胞介在性DTH反応に対しその抑制活性を失うことが表XIから明らかである。対照的に、ヘパリンおよびLMWHは周囲温度で徐々にそれらの抗凝固活性を失う。

表XI. DTH-反応に対する20℃におけるプロタミンスルフェートを  
使用しないフラグミン（バッチ38609、5  $\mu$ g/0.1 ml）の抑制活  
性の安定性

No. 時間	DTH 反応	抗DTH 反応性、%
なし	17.5 $\pm$ 1.2	対照 *
0	2.6 $\pm$ 0.5	100 **
24	9.6 $\pm$ 1	47
48	15.7 $\pm$ 1.6	13
72	17 $\pm$ 0.8	0

\* 抑制なし

\*\*完全抑制

#### 6. 2. 低温における抗DTH反応性の損失および添加プロタミンの 安定化効果

表XIIは、フラグミンが希薄な溶液中で4℃で4ヶ月以内にマウスT細胞のDTH反応性を抑制するその能力を失うことを示す。等しい濃度のプロタミンスルフェートの添加はDTH反応の抑制に干渉しないが、実際にはこの活性を4℃で4ヶ月後に無傷に保存する。再度、この結果はヘパリンまたはフラグミンに添加された場合のプロタミンスルフェートの通常の役割とは逆であり、この場合、プロタミンスルフェートはヘパリノイド物質の抗凝固作用を中和する。

表XII. 低温における経時の抗DTH 活性の損失、添加プロタミンの安定化効果

フラグミン (38609)	月数 4 °C	プロタミン スルフェート	DTH (10 <sup>-2</sup> mm)	抗DTH 活性 %
なし	なし	なし	15±1	対照*
あり	1	なし	2.8 ± 0.5	100 **
あり	1	あり	3 ± 0.4	100
あり	2	なし	4 ± 0.8	82
あり	2	あり	2.4 ± 1	100
あり	3	なし	9.6 ± 0.8	55
あり	3	あり	3 ± 0.5	100
あり	4	なし	14.8 ± 1.4	0
あり	4	あり	3 ± 0.4	100
あり	0	あり	3 ± 0.5	100

\* 抑制なし

\*\*完全抑制

### 6. 3. ECM被覆プレートの調製

ECM被覆ウェルを以下のようにして調製した。新たに切開したウシの眼を屠殺後数時間以内に屠場から得た。眼をフード中で切開して角膜を除去した。次に角膜をメスで引っ掻き、またはこすり落として角膜内皮細胞を得た。これらの細胞を、安定剤としての1%のグルタミンと一緒に10%のウシ胎児血清、5%のウシ血清および抗生物質、例えば、1%のストレプトマイシンまたは1

%のネオスタチンを補給したDMEMを含む培地約5 mlで組織培養プレートで培養した。接種の約2日後にプレートの底に沈降した細胞に4日毎に新しい培地を供給し、そして37℃で5% CO<sub>2</sub>の保湿インキュベーター中でインキュベートした。所望により、若干の繊維芽細胞成長因子を培地にまた添加してもよいが、FGFの添加は重要ではない。細胞が集密した時(約2週間後)、上澄みを吸引して除き、

次に細胞をトリプシン 1 ~ 2 ml でトリプシン処理した。

これらの一次細胞の80% (一次細胞の残りの20%の運命は直後に記載される) を取り出し、5つの平底96ウェルプレートに分けた。細胞を、4%のデキストランT-40、10%のウシ胎児血清および5%のウシ血清を補給したDMEM中で培養した。10% CO<sub>2</sub> の保湿インキュベーター中で37℃で約7日インキュベートした後、得られる内皮細胞の集密層を溶解した。PBS中0.25%のトリトンXを含む0.025MのNH<sub>4</sub>OHを含む溶解緩衝液を細胞上に10分間残存させ、次いで静かに取り除いた。次にプレートの内容物を、4℃に冷却したPBSで3回洗浄した。先の操作はECMを無傷で残し、ウェルの全領域にしっかりと付着させた。また、得られるECMは核および細胞残骸を含んでいなかった。ECM被覆プレートは少なくとも3ヶ月にわたって4℃で貯蔵し得る。

一次細胞の残りの20%を単一プレートに残し、そして10%のウシ胎児血清、5%のウシ血清および上記の抗生物質を補給したDMEMを含む培地約5 ml 中で培養した。この細胞の二次クロップを集密になるようにし、上記のようにしてトリプシンで処理した。再度、トリプシン処理した細胞を分け、80%を5つのプレート中

で4%のデキストランT-40を含む増殖培地中で培養し、そして20%を前記の単一プレート中で培養した。この80/20の分割をこの単一プレートからもう一度行うことが可能である。

#### 6. 4. 硫酸化したプロテオグリカンの分解

<sup>35</sup> (S) O<sub>4</sub> 標識 ECM を PBS 1 ml および 8.2M のリン酸-クエン酸緩衝液 (pH 6.2) 10 O<sub>μ</sub> l 中で 37℃ で 48 時間にわたって MM5 ヘパラナーゼ (4u/ml) 5 μ l でインキュベートした。次に培地を回収し、10,000g で 5 分間遠心分離し (任意)、そしてセファロース 4B カラムによるゲル濾過により分析した。画分 2 ml を 5 ml / 時間の流量で PBS で溶離し、そしてバイオフィルオー・シンチレーション液を使用して放射能につき計測した。

この<sup>35</sup> (S) O<sub>4</sub> 標識実験は、ECM が実際に分解されていること、得られる分解生成物がうまく放出され、更に、セファロース 4B カラムにより適当に濾過されていることを示した。硫酸化したプロテオグリカンの分解に関するその後の実験を標

識されていないECMにつき行い、分解生成物を206または232nmにおけるそれらの吸収により監視した。

酵素分解実験を上記のようにして行い、加えて、分解生成物 (DECM) を、セファロースカラムから溶離された分解プロテオグリカンを用いたHPLCカラムに装填することにより更に精製した。セファロースカラム画分のHPLC分析を第6.11節以下に記載されたような方法で行った。分解生成物の検出を206nmにおけるそれらの吸収を監視することにより行った。

追加の酵素分解実験を、PC3酵素およびIBEXから得られたヘパ

ラナーゼを使用して行い、同様の結果を得た。

#### 6.5. ヒトCD4<sup>+</sup> T細胞の精製

CD4<sup>+</sup> T細胞を、以下のようにして健康なヒトドナーから得られた末梢血単核白血球から得た。単核細胞をフィコール勾配で単離し、ペトリ皿中で10%のFCSおよび抗生物質を補給したRPMI中で洗浄し、そして10% CO<sub>2</sub>の保湿雰囲気中で37℃でインキュベートした。1時間後、非付着細胞を除去し、10% CO<sub>2</sub>の保湿雰囲気中で37℃で45-60分間にわたってナイロン-ウールカラム (フェンウォール、IL) でインキュベートした。非付着細胞を溶離し、洗浄した。CD4<sup>+</sup> T細胞を磁性ビーズ (アドバンスト・マグネチックス、ケンブリッジ、MA) に接合された下記のモノクローナル抗体 (mAb) : 抗-CD8、CD19、およびCD14の混合物への溶離細胞の露出により負に選択した。未結合細胞を回収し、それらの表現型を調べた。得られた精製細胞はFACSscan分析により測定して主として (>90%) CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> であった。

#### 6.6. PBLに由来するヒトCD4<sup>+</sup> T細胞を使用するTNF- $\alpha$ 活性の

##### バイオアッセイ

25万個のヒトCD4<sup>+</sup> T細胞を、7% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で37℃で1.5時間にわたって種々の濃度のECM分解生成物150  $\mu$  lでプレインキュベートした。次にPHA (ウェルカム社、英国、1  $\mu$  g/ml) 100  $\mu$  lを平底の96ウェルプレート (コスター) 中で3時間のインキュベーションのために添加した。続いて、ウェル (実験群当たり3~6のウェル) の内容物を回収し、遠心分離し、そして培地を



第5. 1. 節に先に記載されたようにしてTNF- $\alpha$ 分泌につき分析した。簡単に言えば、培養白血球の上澄みをマウス繊維肉腫細胞クローン (BALB/c.CL7) の培養物に添加した。BALB/c.CL7細胞はアクチノマイシンD ( $0.75 \mu\text{g/ml}$ ) の存在下でTNF- $\alpha$ による死滅に対し感受性である。Nophar, Y. らJ.Immunol. (1988) 140 (10) : 3456-3460。試験培地の存在下のこれらの細胞の死亡を、添加した外因性TNFの滴定曲線と比較して校正した。細胞生存度を、MTTテトラゾリウム (シグマ、カタログ番号M2128) で2時間インキュベートし、細胞により摂取された色素をイソプロパノール-HCl混合物で抽出し、そしてそれをマイクロエリサ・オートリーダーで (Microelisa Autoreader) 比色 (570nm) 定量化することにより測定する。TNF- $\alpha$ 型別を抗マウスTNF- $\alpha$  mAb (1/400に希釈; ゲンザイム、MA) の中和作用を調べることにより行った。

#### 6. 7. ヘパリンの分解

PBS  $1 \text{ ml}$  および25Mのリン酸-クエン酸緩衝液 (pH6.2)  $100 \mu\text{l}$  中のヘパリン (シグマ)  $1 \text{ mg}$  を  $37^\circ\text{C}$  で48時間にわたってMM5 ( $5 \text{ u/ml}$ )  $20 \mu\text{l}$  でインキュベートした。次にその反応の生成物をセファロース4Bカラムによるゲル濾過により分析した。画分  $2 \text{ ml}$  を  $5 \text{ ml/時間}$  の流量でPBSで溶離した。分解生成物を更に特性決定するために、セファロースカラムから溶離されたピークを、第6. 1. 1節以下に記載されたようにしてトーヨーソーダーゲルG3000SWおよびG2000SW HPLCカラムを使用するHPLC分離にかけた。

PC3  $20 \mu\text{l}$  を使用して、追加実験を行った。PC3酵素反応を、その反応を48時間に代えて24時間インキュベートした以外は、MM

5につき上記されたのと同じ条件下でヘパリン  $1 \text{ mg}$  を用いて行った。次に生成物をセファロース4Bカラムによるゲル濾過により分析した (図29)。試験管内バイオアッセイの結果が下記の表XIXに示される。

#### 6. 8. マウスにおけるDTH応答の誘発および抑制効果の試験

BALB/cマウス (群当たり少なくとも5匹のマウス) を、局所適用したアセトン/オリーブ油中の3%の4-エトキシメチレン-2-フェニルオキサゾロン (OX; BDHケミカルズ、GB) で剃った腹部で感作した。DTH感受性を以下のようにして

5日後に誘発した。マウスにアセトン／オリーブ油中0.5%のOXで抗原投与した。耳を抗原投与の直前および24時間後にミットヨ・エンジニアのマイクロメーター（日本）で測定した。耳の膨化を測定する個体をマウスの群の同一性につき盲検した。DTH応答を干渉するために、PBS中で希釈した低分子量の免疫調節画分を、示された時間スケジュールおよび濃度で処置マウスの背部に皮下投与した。処置マウスを処置中および治療後（>2ヶ月）に検査し、重大な副作用が臨床上観察されなかった。

#### 6. 9. サイズ排除ゲルクロマトグラフィーカラム（セファロース

##### 4B）によるLMMH（フラグミン）の分離

フラグミン（バッチ38609）および不活性フラグミンをセファロース4B（ファルマシア）カラムによるゲル濾過により分別した。画分0.5mlを5ml／時間の流量でPBSで溶離し、206nmにおける吸収につき監視した（吸収は280nmで検出されなかった）。画分

番号対206nmにおける吸収のプロットが図11に見られる。選択された画分に関するバイオアッセイの結果が下記の表XIIIおよびXIVに示される。

表XIII. ヒトPBL バイオアッセイを使用する活性TNF の分泌に関する全フラグミン、フラグミンのセファロース4B画分、およびセファロース4B画分のHPLC画分の効果

試験物質	濃度 (pg/ml)	TNF 活性	
		のバイオ アッセイ (%)	"R" 値 % x (pg/ml)
活性			
Frag/ 全体	1	Inh <sub>max</sub> (90 %)	90
不活化			
Frag/ 全体	a	効果なし	0
不活化			
Frag/Seph. 4B-F15	5	Inh <sub>max</sub> (50 %)	50
不活化			
Frag/Seph. 4B-F10	a	効果なし	0
不活化			
Frag/Seph. 4B-F8	1000	Aug <sub>max</sub> (60 %)	0.06
不活化			
Frag/Seph. 4B-F2	1000	Aug <sub>max</sub> (30 %)	0.03
Frag/HPLC-F90	b	効果なし	0

a 1  $\mu$ g/ml - 0.001 pg/ml の濃度範囲にて

b 1  $\mu$ g/ml - 0.01 pg/ml の濃度範囲にて

表XIV. マウスのDTH 感受性に関する全フラグミンおよびフラグミンのセファロース4B画分の効果

試験物質	投与量 ( $\mu\text{g/gm}$ マウス)	DTH の抑制 "R" 値 ( $>50\%$ )	% x ( $\mu\text{g/gm}$ ) <sup>-1</sup>
活性			
Frag/ 全体	0.2	50	250
不活化			
Frag/ 全体	0.2-0.004	効果なし	0
不活化			
Frag/Seph. 4B-F15	0.004	50	12,500
不活化			
Frag/Seph. 4B-F10	0.2-0.004	効果なし	0

#### 6. 10. フラグミンおよびヘパラーゼ分解ECMの分別を伴う追加実験

フラグミンおよびヘパラーゼ分解ECMをセファロース4Bカラムによるゲル濾過により分別した。0.2mlの画分を5ml/時間の流量でPBSで溶離し、206nmにおける吸収につき監視した（吸収は280nmで検出されなかった）。画分番号対206nmにおける吸収のプロットが図14に見られる。選択された画分に関するバイオアッセイの結果が下記の表XVに示される。

表XV. ヒトPBL バイオアッセイを使用する活性TNF の分泌に関するフラグミンおよびDECMのセファロース4B画分の効果

試験 画分	濃度 (pg/ml)	TNF 活性 のバイオ アッセイ (%)	“R” 値 % x (pg/ml) <sup>-1</sup>
Frag/Seph. 4B-F39	100	Inh <sub>max</sub> (60 %)	0.6
DEMC/Seph. 4B-F39	10,000	Inh <sub>max</sub> (85 %)	0.0085
Frag/Seph. 4B-F42	a	効果なし	0
DECM/Seph. 4B-F42	a	効果なし	0
Frag/Seph. 4B-F32	10	Aug <sub>max</sub> (55 %)	5.5
DECM/Seph. 4B-F46	10	Aug <sub>max</sub> (20 %)	2

a 1 μg/ml - 0.001 pg/ml の濃度範囲にて

#### 6. 1.1. 高速液体クロマトグラフィーを使用するフラグミンからの 活性物質の分離

高速液体クロマトグラフィー条件の二つの組を使用して二つの実験を行った。使用したカラムの初期の型は4 cm × 内径6 mmのガードカラムを備えた30cm × 内径7.8mmのTSK-Gel (商標) G-Oligo-PWカラムであった。そのカラムを0.5ml/分の流量で0.2Mのリン酸緩衝液、pH7.0で溶離した。回収した画分は夫々0.5mlの容量であった。

使用したHPLCの第二の型はフェノメネックスからの7.5mm × 10cmのガードカラムを備えたトーヨーソーダTSK-Gel G3000SW (7.5mm × 50cm) およびG2000SW (7.5mm × 50cm) であった。そのカラムを注意して脱気した0.5MのNaClで1 ml/分で溶離した。画分を画分当たり0.5mlで回収した。検出器を0.02AUFSで232nmにセットし、保持時間を±0.1秒まで測定した。ポイド容積および全容積をブルーデキ

ストランおよびアジ化ナトリウムにより測定した。また、回収物を232nm設定と同じ条件下で206nmで検出にかけた。

フラグミンHPLC画分番号対206nmにおける吸収のプロットが図18Aに見られる。選択された画分に関するバイオアッセイの結果が下記の表XVIに示される。示された結果から、或る種の物質がTNF- $\alpha$ の活性を抑制することができ、一方、その他の物質がその活性を促進できることが明らかである。

表XVI. ヒトPBL バイオアッセイを使用する活性TNF の分泌に関するフラグミンの全画分およびHPLC画分の効果

フラグミン 画分	濃度 (pg/ml)	TNF 活性	
		のバイオ アッセイ (%)	"R" 値 % x (pg/ml) <sup>-1</sup>
全体 <sup>a</sup>	10	Inh <sub>max</sub> (40 %)	4
HPLC-F1	100	Aug <sub>max</sub> (60 %)	0.6
HPLC-F3	10	Inh <sub>max</sub> (70 %)	7
HPLC-F16	10	Inh <sub>max</sub> (100%)	10
HPLC-F22	10	Inh <sub>max</sub> (100%)	10
HPLC-F26	100	Inh <sub>max</sub> (50 %)	0.5
HPLC-F30	100	Inh <sub>max</sub> (70 %)	0.7
HPLC-F47	100	Inh <sub>max</sub> (55 %)	0.55

<sup>a</sup> この全フラグミン試料は4℃で90日熟成されていた。

#### 6. 1 2. 高速液体クロマトグラフィーを使用するECMからの活性物質の分離

高速液体クロマトグラフィーによるECMからの活性物質の分離を第6. 1 1節に説明されたようにして行った。

ECM HPLC画分番号対206nmにおける吸収のプロットが図18Bに見られる。選択された画分に関するバイオアッセイの結果が下記の表XVIIに示される。示された結果から、ECMのヘパラーゼ介在性分解から単離された或る種の物質がTNF- $\alpha$ の活性を抑制することができ、一方、その他の物質がその活性を促進できることが明らかである。また、これらの結果は、HPLC分離から得られた或

る画分がTNFの活性に対して効果を示さないことを示す。

表XVII. ヒトPBL バイオアッセイを使用する活性TNF の分泌に関するDECM HPLC 画分の効果

DECM 画分	濃度 (pg/ml)	TNF 活性 のバイオ アッセイ (%)	"R" 値 % x (pg/ml) <sup>-1</sup>
HPLC-F1	a	効果なし	0
HPLC-F5	a	効果なし	0
HPLC-F10	10	Inh <sub>max</sub> (60 %)	6
HPLC-F14	10	Inh <sub>max</sub> (70 %)	7
HPLC-F17	a	効果なし	0
HPLC-F25	1000	Aug <sub>max</sub> (40 %)	0.04
HPLC-F33	100	Aug <sub>max</sub> (40 %)	0.4
HPLC-F37	10	Aug <sub>max</sub> (100%)	10
HPLC-F39	100,000	Inh <sub>max</sub> (60 %)	0.0006
HPLC-F42	a	効果なし	0
HPLC-F46	1000	Aug <sub>max</sub> (30 %)	0.03
HPLC-F49	1000	Aug <sub>max</sub> (30 %)	0.03
HPLC-F61	a	効果なし	0

a 1  $\mu$ g/ml - 0.001 pg/ml の濃度範囲にて

#### 6. 1 3. カルバゾール定量糖アッセイ

簡単に言えば、ホウ酸塩硫酸試薬1500 $\mu$ lを氷浴で冷却する。次に試験溶液（ウロン酸20 $\mu$ g/mlを含む250 $\mu$ l）をホウ酸試薬の表面に慎重に層形成し、10分間拡散させる。次にこれらの溶液を十分に混合し、沸騰浴に10分間入れ、次に氷浴中で冷却する。次に冷却カルバゾール（50 $\mu$ l）を混合物に添加し、攪拌し、沸騰浴に15分間入れる。次にその溶液を冷却し、吸光度を525nmで読み取る。結果を校正溶液と比較する。

#### 6. 1 4. ECM分解生成物からの二糖の単離

二糖物質を、哺乳類ヘパラーゼ（MM5）にかけられたウシ角膜内皮ECMからHP

LCにより単離した。

更に詳しくは、ECM被覆プレート<sup>®</sup>を37℃で48時間にわたってPBS緩衝液1ml（クエン酸によりpH6.2に前もって調節された）中の哺乳類ヘパラーゼ（0.5mg/ml）20 $\mu$ lでインキュベートした。次にその培地を回収し、セファロース-4Bカラム（35cm x 内径0.7cm）に適用した。移動相は5 ml/時間の流量のPBS緩衝液であった。2.2mlの画分を回収し、206 nmで監視した（図19）。セファロース4B画分番号5（8.8-11mlの溶離容積）からの試料（100 $\mu$ l）をHPLCカラム（フェノメネックスからの7.5mm x 10cmのガードと直列のトーヨーソーダTSK-GeI G3000SW（7.5mm x 50cm）およびG2000SW（7.5mm x 50cm））に注入した。移動相は1 ml/分の流量の0.5MのNaClであった。画分1 mlを回収し、206nmおよび232nmで監視した（図20Aおよび20B）。ピーク番号1（P1）を25mlのフラスコ中で凍結乾燥した。その試料は60mgのNaCl中オリゴ

糖約20 $\mu$ gを含む（カルバゾールアッセイにより測定）。

その試料は、ヘパリンの解重合から商業上得られる二糖標準物質または分子量“マーカー”（シグマ）に似ている溶離プロフィールを有する。

同様に得られた試料（例えば、図21A中のピークF73（約44分の溶離時間）および下記の表XVIII中のエントリーF5/HPLC-F73を参照のこと）を基準とするその物質の $\text{Inh}_{50}$ 値を、約10pg/mlの濃度でヒトPBLを使用して試験管内のTNF- $\alpha$ 阻害アッセイで87%と推定した。そのバイオアッセイを上記のようにして行った。この試料は上記のようにしてSAX-HPLCカラムを使用して更に精製し得る。

#### 6. 1 5. SAX-HPLCクロマトグラフィーを含むECM分解生成物からの二糖の単離

ECM被覆プレート<sup>®</sup>を37℃で48時間にわたってPBS緩衝液1ml（クエン酸によりpH6.2に前もって調節された）中の哺乳類ヘパラーゼ（0.5mg/ml）20 $\mu$ lでインキュベートした。次にその培地を回収し、セファロース-4Bカラム（0.7 x 35cm）に適用した。移動相は5 ml/時間の流量のPBS緩衝液であった。1.6mlの画分を回収し、206nmで監視した（図22）。画分番号7-8を合わせ、凍結乾燥した。その粉末を初期の容積の1/10で再度懸濁させた。試料（100 $\mu$ l）を上記のようにHPLCカラム（フェノメネックスからの7.5mm x 10cmのガードと直列のトーヨーソー



ダTSWK-Ge1 G3000SW7.5mm x 50cmおよびG2000SW7.5mm x 50cm) に注入した。移動相は1 ml/分の流量の0.5MのNaClであった。画分1 mlを回収

し、206nmおよび232nmで監視した(図23)。“1”とラベルしたピークを10回の同じ実験から回収した。実質的に均一な画分を合わせ、凍結乾燥した。

その物質を2 mlの二重脱イオン水中で懸濁させ、セファデックスG-10カラム(26 x 150mm)で脱塩し、二重脱イオン(DD)水で1.6ml/分で溶離した。画分1 mlを回収し、232nmで導電率につき監視した(NaCl含量を測定するため)。脱塩画分を合わせ、凍結乾燥し、1 mlのDD H<sub>2</sub>O中で再度懸濁させた。再度懸濁させた溶液100 $\mu$ lおよび0.2MのNaCl900 $\mu$ lをpH3.5で合わせるにより調製した試料1 mlを分析用SAX-HPLCカラム(4.6 x 250mm、スフェリソープ(Spherisorb)、粒径5- $\mu$ mを充填した)に注入した。流量は1.5ml/分であり、NaCl線形勾配プログラムを以下のようにして使用した。

時間／緩衝液 (分)	A (%)	B (%)	C (%)
0	100	0	0
2	100	0	0
35	38	62	0
40	38	62	0
45	0	100	0
47	0	100	0
50	0	0	100
55	0	0	100
58	100	0	0
60	100	0	0

A = 0.2MのNaCl、pH3.5

B = 1.5MのNaCl、pH3.5

C = H<sub>2</sub>O

カラム溶離液を232nmで監視し(図24)、ピークA23/4を回収し、TNF抑制につき試験した。このSAX-HPLC画分に関する $\text{Inh}_{\text{max}}$ は0.1pg/mlの濃度で60%であり、 $600\% \times (\text{pg/ml})^{-1}$ の“R”値を与えることがわかった。

硫酸化の異なるレベルを有するヘパリン二糖標準物質を同一条件下でSAX-HPLCカラムに注入した。これらの標準物質の溶離プロファイルが図25A-Cに示される。これらの図からわかるように、二糖標準物質は異なる保持時間を生じ、硫酸化されていない二糖(シグマ製品番号H-0895)が最も早く溶離し(図25A)、二硫酸化二糖(シグマ製品番号H-1020)が20分未満で溶離し(図25B)、そして三硫酸化二糖(シグマ製品番号9267)が最後に溶離した(図25C)。三硫酸化二糖標準物質H-9267は、ピークA23/4につき得られた保持時間に非常に似た保持時間を与えた(即ち、それぞれ23.07分対23.10分)。

#### 6. 1 6. 種々の物質に関する試験管内のヒトPBLバイオアッセイの結果

種々の活性物質および出発“混合物”に関するヒトPBLを使用する試験管内のバイオアッセイの結果が、図20からのピーク“P1”を含むECMの分解から得られた生成物につき表XVIIIに示される。一方、P1は $10\% \times (\text{pg/ml})^{-1}$ の“R”値を与え、出発DECM“スー

ブ”は $0.000053\% \times (\text{pg/ml})^{-1}$ の“R”値を与えた。

表 XVIII. ヒト PBL バイオアッセイを使用する活性 TNF の分泌に関する ECM + MM5 ヘパラーゼ (DECM “スープ”)、 “スープ” のセファロース 4B 画分、 およびセファロース 4B 画分の HPLC 画分の効果

試験 物質	濃度 (pg/ml)	TNF 活性 のバイオ アッセイ (%)	R” 値 % x (pg/ml) <sup>-1</sup>
		Inh <sub>max</sub>	
DECM “スープ”	1 x 10 <sup>6</sup>	(53 %)	5.3 x 10 <sup>-5</sup>
Seph. 4B-F5	100	(50 %)	0.5
Seph. 4B-F6	100	(60 %)	0.6
Seph. 4B-F7, 8	100	(81 %)	0.8
F5/HPLC-F73	10	(87 %)	8.7
F5/HPLC-F65	10	(78 %)	7.8
F5/HPLC-F22	10	(33 %)	3.3
F6/HPLC-F86	10	(43 %)	4.3
P1	10	(100 %)	10.0

#### 6. 17. ヘパリン分解生成物からのオリゴ糖の単離

ECMの分解に関して上記された方法と同様の方法で、無傷ヘパリンを、本明細書中MM5およびPC3と称される種々の源から得られたヘパラーゼ酵素で処理した (PC3酵素の調製につき、Sho-seyov, O. ら, Biochem., Biophys. RES. COMM. (1990) 169: 667-672を参照のこと)。出発分解混合物の一部をセファロース 4Bで分離

した (ヘパリン+MM5セファロース 4B画分F7およびF8について図26、並びにヘパリン+PC3のセファロース 4BクロマトグラフィーおよびPC3単独について図27を参照のこと)。更に別の画分を上記のHPLC II方法により更に分離した (画分F7/HPLC-F86、-F84、および-F90について図28Aおよび28Bを参照のこと)。また、“無傷”ヘパリンおよびフラグミンを直接HPLC II条件にかけ、選択された画分を同様に単離した (フラグミンからのHPLC-F90が図29に示される)。種々の活性物質

および出発“混合物”に関するヒトPBLを使用する試験管内のバイオアッセイの結果が、ヘパリンの分解から得られた生成物を含む表XIXに示される。

表XIX. ヒトPBL バイオアッセイを使用する活性TNF の分泌に関する無傷ヘパリン、ヘパリン + MM5またはPC3 “スープ”、並びにこれらの選択されたセファロース4B画分およびHPLC画分の効果

試験物質	濃度 (pg/ml)	TNF 活性 のバイオ アッセイ (%)	R <sup>2</sup> 値 % x (pg/ml) <sup>-1</sup>
無傷ヘパリン	a	効果なし	0
Hep/HPLC-F90	a	効果なし	0
追加のヘパリン画分			
F7/HPLC-F86	0.1	Inh <sub>max</sub> (26 %)	260
F8/HPLC-F84	a	効果なし	0
F8/HPLC-F90	a	効果なし	0
Hep/PC3 “スープ”	0.1-10 x 10 <sup>6</sup>	効果なし	0
Seph. 4B-F9	100	Inh <sub>max</sub> (50 %)	0.5
Seph. 4B-F8	100	Inh <sub>max</sub> (40 %)	0.4
PC3 のみ	a	効果なし	0
Seph. 4B-F8	a	効果なし	0
Seph. 4B-F9	a	効果なし	0

a 1 μg/ml - 0.01 pg/ml の濃度範囲にて

#### 6. 18. 種々の物質で治療したマウスの *in vivo* のDTH反応性の

##### 結果

種々の物質を *in vivo* のバイオアッセイ条件下で試験し、それらの精製の状態に応じて異なる程度でマウスの実験DTH感受性を抑制することがわかった。マウスを、上記の項目5.1および5.2に記載されたようにして活性物質で処置した。一般に、高圧液体クロマトグラフィーにより実質的に均一に精製された物質は数万の“R”値を与える。実験の一つの群に関する結果が表XXに示される。

表 X X. 各種物質によるマウスの過 1 回処理およびマウスの D  
T H 感受性に及ぼすその効果

試験物質	投与量 ( $\mu\text{g/gm}$ マウス)	DTH の応答 ( $10^{-2}\text{mm}$ )	阻害 (%)	"R" 値 $\% \times (\mu\text{g/gm})^{-1}$
なし	-	$17.2 \pm 2$	0	-
(-) 対照		2	-	-
0.5 M NaCl	-	$16.5 \pm 1.5$	5	-
完全ヘパリン	a	-	効果なし	0
フラグミン				
バッチ 38609	0.2	$3 \pm 1$	85	425
DECM				
MM5 "スープ"	a	-	効果なし	-
Seph. 4B-F6	0.032	$16.5 \pm 5$	5	-
	0.016	$16 \pm 2$	10	-
	0.0032	$14 \pm 2$	20	-
	0.0006	$7.1 \pm 1$	65 (max)	110,000
F6/HPLC-F9	0.032	$11 \pm 2$	40	-
	0.01	$17 \pm 2$	0	-
	0.002	$6 \pm 0.5$	70	-
	0.0006	$6 \pm 1.2$	70 (max)	120,000
F6/HPLC-F11	0.02	$17 \pm 3$	0	-
	0.01	$13 \pm 1$	25	-
	0.001	$9.5 \pm 2.5$	55	-
	0.0006	$2.8 \pm 0.5$	90 (max)	150,000
F6/HPLC-F12	0.02	$18 \pm 2$	0	-
	0.01	$15 \pm 2$	15	-
	0.001	$8.2 \pm 1.5$	60	-
	0.0006	$4 \pm 1$	80 (max)	130,000

a : 0.04 - 0.0004  $\mu\text{g/gm}$  マウスの投与量範囲

表 X X から明らかなように、完全ヘパリンおよび出発物質である ECM+MM  
5 "スープ" はインビボで何ら効果を示さなかった。後者の場合には、阻害成分  
と促進成分とが打ち消しあったために効果が得られなかったものと思われる。フ

ラグミンの新鮮試料（バッチ38609）は中程度の“R”値を示し、これは前の実験（最初の記載、表IX参照）で得られたものと匹敵する。セファロース4B画分はHPLC II条件下で得られた対応画分よりもやや低い“R”値を示した。

以下の表XXIに示す別の実験から得られた結果によって、出発物質であるECM+MM5”スープ”には何ら効果のないことが確認された。マウスに皮下注入したときに非常に高い比調節活性（“R”値=454, 545% x ( $\mu\text{g/gm}$ )<sup>-1</sup>)を示すHPLC II画分no. F5/HPLC-L22は高投与量においてではあるが、経口活性も示した（“R”値+5, 000% x ( $\mu\text{g/gm}$ )<sup>-1</sup>）。ECMから単離した活性物質はフラグミンから得られた活性物質よりも大きなインビボ比調節活性を示すこともまた表XXIから明らかである。したがって、見かけの脱硫酸化が本発明の活性物質の特異的阻害活性を減少する。実際、インビボのバイオアッセイ条件下においては、促進した“R”値がこのような”脱硫酸化”二糖から得られた。

また、さらなる実験によって、硫酸基をもたない単糖または単純糖であるガラクトサミンが本発明の硫酸化オリゴ糖の阻害活性のアンタゴニストとして作用し得ることが示された。したがって、脱硫酸化オリゴ糖が、直接の促進成分として、あるいはカルボキシル化および／または硫酸化オリゴ糖の特異的阻害活性のアンタ

ゴニストとして作用することもありうる。本発明者らのこれらの知見は、ある種の物質（例えば三硫酸化二糖）が活性TNF- $\alpha$ の分泌の未同定の天然阻害剤のアンタゴニストとして作用するというメカニズムとも一致する。

表 X X I . 各種物質で皮下処理されたマウスに対するインビボの D T H 反応性データ

試験物質	投与量 ( $\mu\text{g/gm}$ マウス)	DTH 応答 ( $10^{-2}\text{mm}$ )	Inh <sub>max</sub> (%)	"R" 値 $\% \times (\mu\text{g/gm})^{-1}$
ECM + MM5 "スーブ"	a	$20.4 \pm 0.7$	効果なし	0
F5/HPLC-L22	0.008 <sup>b</sup>	$13.2 \pm 1.3$	$40 \pm 12\%$	5,000
F5/HPLC-L22	0.000132	$9.7 \pm 1.3$	$60 \pm 17\%$	454,545
フラグミン				
FR/HPLC-2	0.00048	$8.5 \pm 1.3$	$70 \pm 20\%$	145,833

a : 0.04 - 0.0004  $\mu\text{g/gm}$  マウスの投与量範囲

b : 経口投与

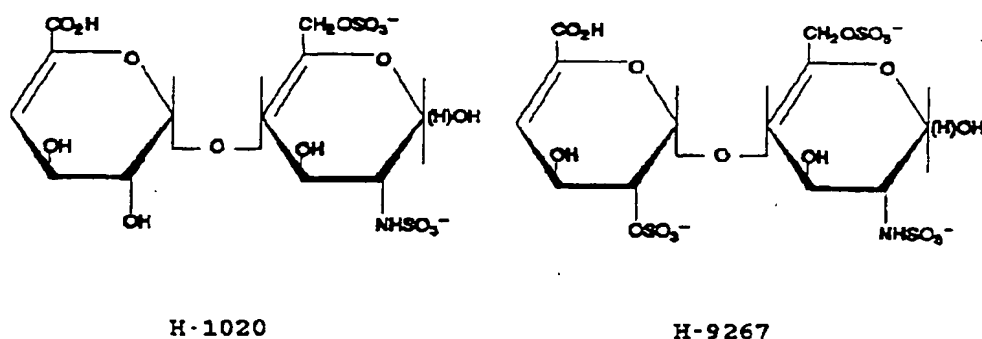
陽性対照群は  $20.0 \pm 1.1$  の D T H 応答を示し、陰性対照群は  $2.0 \pm 1.0$  の D T H 応答を示した。

#### 6. 19. SAX-HPLC 画分と既知の二糖マーカのインビ

##### ボ活性の比較

マウスにおける相対 D T H 反応性の阻害能をインビボ条件下で求めるために、2つの二糖マーカを試験した。表 X X I I に示すように、2つのマーカ (H-1020 および H-9267) はマウスに皮下注入すると  $140,000 - 160,000\% \times (\mu\text{g/gm})^{-1}$  の "R" 値を示し、中程度の活性を示した。マーカ H-1020 は経口でも試験したところ、中程度の活性 ("R" 値 =  $531\% \times (\mu\text{g/gm})^{-1}$ ) を示した。H-1020 マーカは O, N-二硫酸基であるが、H-9267 は O, O, N-三硫酸基である。これらの構造を下記に示す。





表XXIIに示すように、SAX-HPLC画分L22/SAX-A23/4 (図24)は、それ自体高い比調節活性を示すF5/HPLC-L22よりもさらに良好な結果を与え、 $630, 303\% \times (\mu\text{g/gm})^{-1}$ の“R”値を示し、一方F5/HPLC-L22は $454, 545\% \times (\mu\text{g/gm})^{-1}$ の“R”値を示した(表XXI)。しかしながら、SAX-HPLCカラムにおける保持時間がH-9267とほぼ同じであるこの二糖物質は、

pH約3.5において室温で数日のうちに硫酸基を失うことが見いだされた。したがって、SAX-HPLCカラムを通過した古くなった試料を再分析したところ、23.10分にあったもとのピークが、図30で2039/1、2039/2および2039/3と命名した3つの主要ピークに変わっており、これらはいずれもA23/4よりも短い保持時間を有していた。H-1020マーカとほぼ同じ保持時間を有するピーク2039/3はN-硫酸基を失っていると思われる。ピーク2039/1および2039/2は一硫酸化または完全に脱硫酸化された二糖と対応すると思われる。(これらの保持時間は硫酸基をもたないN-アセチルグルコサミノグリカンである二糖マーカH-0895に匹敵する)。

これらの“脱硫酸化”物質をそれぞれ回収してインビボのDTHバイオアッセイ条件下において試験したところ、驚くべきことに、中程度のみの活性か、あるいは全く活性を示さないことが判明した(表XXII参照)。実際、インビトロのヒトPBL検定においては、これらの3つのピークは活性TNF- $\alpha$ 分泌の増強を示した。これらのインビトロでの結果を以下に示す：

SAX-HPLC	濃度	Aug <sub>max</sub>	"R" 値
ピーク	(pg/ml)	(%)	% x (pg/ml) <sup>-1</sup>
2039/1	1	5	5
2039/2	1	35	35
2039/3	1	42	42

表XXII. 皮下投与した各種二糖を用いたインビボ結果の追加

試験物質	投与量 ( $\mu$ g/gm マウス)	DTH 応答 (10 <sup>-2</sup> mm)	Inh <sub>max</sub> (%)	"R" 値 % x ( $\mu$ g/gm) <sup>-1</sup>
PBS (陽性対照)	-	18.6 $\pm$ 0.7	-	-
ナイーブ (陰性対照)	-	1.4 $\pm$ 0.2	-	-
SAX-HPLC 分画				
A23/4	0.000132	3 $\pm$ 1	83	630,303
2039/3	0.0005	3.1 $\pm$ 1.1	83	166,000
2039/1	0.000132	18.5 $\pm$ 1.1	効果なし	0
"マーカー"				
H-1020	0.0005	4.7 $\pm$ 0.7	73	146,000
H-1020	0.128 <sup>a</sup>	5.9 $\pm$ 0.9	68	531
H-9267	0.0005	3.5 $\pm$ 1	80	160,000

a : 経口投与。

#### 6. 19. 1. 選択された二糖が活性TNF- $\alpha$ のインビボ産生を調節する能力についてのさらなる結果

さらに実験を行って、Sigma Chemical 社から市販されており、本明細書中でそのSigmaカタログ番号で同定する選択された二糖分子がマウスにおける実験的DTH反応を阻害または増強する能力を試験して、これらの哺

乳動物による活性TNF- $\alpha$ の産生を制御する能力の示唆を得た。

特定すると、1群4-12匹のマウスからなるCD1マウス (Weizmann Institute Animal Breeding Center, Rehovot, イスラエルから入手可能) を第5.2. または6.8. 節に記載のように処理した。

各種実験の結果を以下の表XIIIAにまとめる。表から明らかなように、試験した11の二糖のうち4つが投与したオキサゾロンに応答してマウスの耳の腫脹に阻害効果を示した。T細胞媒介性の炎症応答の阻害が、非ゼロの“R”値を示す二糖が活性TNF- $\alpha$ の産生をダウンレギュレートすることができるという示唆として観察される。表に示す結果から、“R”値は比較的中程度の65, 000% x ( $\mu\text{g/gm}$ )<sup>-1</sup>から約1, 500, 000% x ( $\mu\text{g/gm}$ )<sup>-1</sup>までの範囲にわたる。高い“R”値が必ずしも興味のある活性化合物の最も望ましい性質ではないことに注意すべきである。特に、特定化合物が生理学的効果を示す投与量の“窓”は、投与した投与量が有効投与量範囲外になる可能性をより低くするために、出来る限り広くするべきである。表XIIIAの脚注に示すように、試験化合物のうちH-9392

分子が最も広い投与量窓である0.000132-0.004  $\mu\text{g/gm}$ をもつように思われる。

またこれらの結果から、試験した11の二糖のうちの1つが実験的DTH T細胞反応によって引き起こされる腫脹を増強することのできる驚くべき能力をもつことが明らかとなった。硫酸基をもたない化合物H-0895は、マウス1g当たり約1.2 pgの二糖という極めて低い投与量で腫脹の程度に莫大な効果を及ぼす。得られる約76, 700, 000% x ( $\mu\text{g/gm}$ )<sup>-1</sup>という“R”値は現在のところ最高である。

表 X X I I I A. 皮下投与された各種二糖マーカ－を用いる  
インビボ試験の追加的結果

試験物質	投与量 ( $\mu\text{g/gm}$ )	DTH ( $10^{-2}$ mm)	Inh <sub>max</sub> (%)	"R" 値 $\times (\mu\text{g/gm})^{-1}$
H-9392 <sup>a</sup>	0.0012	4.2 $\pm$ 0.7 (17.8 $\pm$ 0.9)	78	6.5 $\times 10^4$
H-1020 <sup>b</sup>	0.0004	6.7 $\pm$ 1.1 (19.6 $\pm$ 1.2)	66	1.65 $\times 10^5$
H-9267 <sup>c</sup>	0.0004	7.2 $\pm$ 1 (19.6 $\pm$ 1.2)	64	1.60 $\times 10^5$
H-9517 <sup>d</sup>	0.00004	7.6 $\pm$ 1 (20.4 $\pm$ 0.7)	62	1.55 $\times 10^6$
H-0895 <sup>e</sup>	0.0000012	37.3 $\pm$ 0.7 (18.9 $\pm$ 0.7)	+92	7.67 $\times 10^7$
H-9017 <sup>f</sup>	N.E.			0
H-8642 <sup>g</sup>	N.E.			0
H-9142 <sup>h</sup>	N.E.			0
H-8767 <sup>i</sup>	N.E.			0
H-8892 <sup>j</sup>	N.E.			0
H-1145 <sup>k</sup>	N.E.			0

a : H-9392は2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェートグルコサミンである。このデータに関するPBS (陽性対照) 値をカッコ内に示す。ナীব (非免疫) マウスの腫脹は2.0  $\pm$  0.5 mmであった。この値を上記のすべての計算に用いた。対照の $\geq 50\%$ 阻害を与える有効投与量範囲は0.000132-0.004  $\mu\text{g/gm}$ であった。

b : H-1020は4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2

ーデオキシ-2-N-スルフェート-6-O-スルフェートグルコサミンである。対照の $\geq 50\%$ 阻害を与える有効投与量範囲は $0.00004-0.0004 \mu\text{g/gm}$ であった。この表中に示す“R”値は上記の表X X I I Iで報告した初期の“R”値によく匹敵する。これらの結果はC D 1株マウスの異なる群におけるインビボ試験法の顕著な再現性を示すものである。

c : H-9267は2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha-1, 4$ )-2-デオキシ-2-N-スルフェート-6-O-スルフェートグルコサミンである。対照の $\geq 50\%$ 阻害を与える有効投与量範囲は狭かった。

d : H-9517は2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha-1, 4$ )-2-デオキシ-2-N-アセチル-6-O-スルフェートグルコサミンである。対照の $\geq 50\%$ 阻害を与える有効投与量範囲は $0.00004-0.00012 \mu\text{g/gm}$ であった。

e : H-0895は4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$

-1, 4)-2-デオキシ-2-N-アセチルグルコサミンである。この結果はD T H反応の増強を示す。対照の $\geq 50\%$ 増強を与える有効投与量範囲は $0.00001-0.00004 \mu\text{g/gm}$ であった。

f : H-9017は4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha-1, 4$ )-2-デオキシ-6-O-スルフェートグルコサミンである。”N. E.”は $0.00004-4 \mu\text{g/gm}$ マウスの試験投与量範囲においては効果が観察されなかったことを示す。

g : H-8642は4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha-1, 4$ )-2-デオキシ-2-N-アセチル-6-O-スルフェートグルコサミンである。

h : H-9142は2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha-1, 4$ )-2-デオキシグルコサミンである。

i : H-8767は2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha-1, 4$ )-2-デオキシ-2-N-アセチルグルコサミンである。

j : H-8892は2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン

酸- ( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-6-O-スルフェートグルコサミンである。

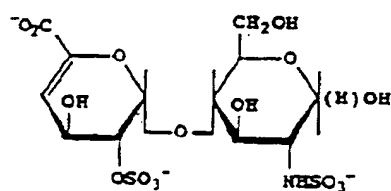
。

k: H-1145は4-デオキシ-4-エン-イズロン酸- ( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェートグルコサミンである。

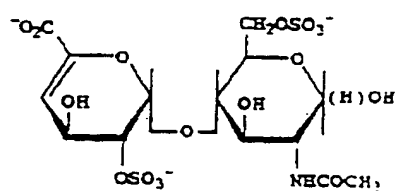
4つの阻害性二糖化合物であるH-9392、H-9517、

H-1020およびH-9267の構造を以下に示す。

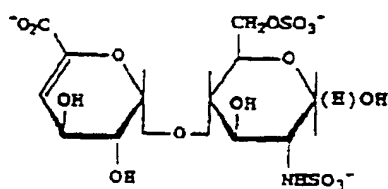
#### 阻害剤



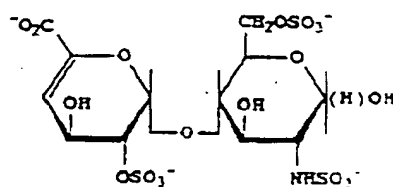
H-9392



H-9517



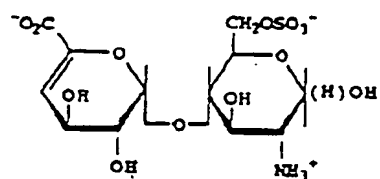
H-1020



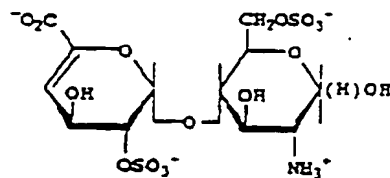
H-9267

試験した11の二糖のうち、6つが一致した効果を示すことができず、したがって“ニュートラル (neutral)”と分類された。これらのニュートラル化合物の構造を以下に示す。

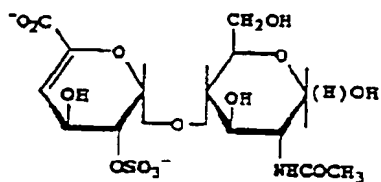
#### ニュートラル化合物



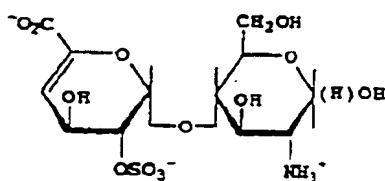
H-9017



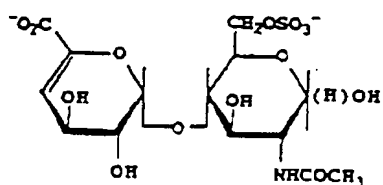
H-8892



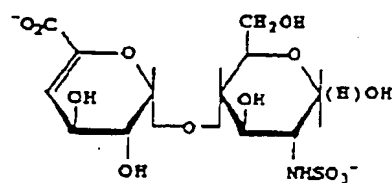
H-8767



H-9142

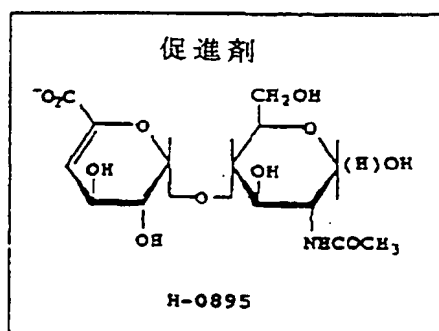


H-8642

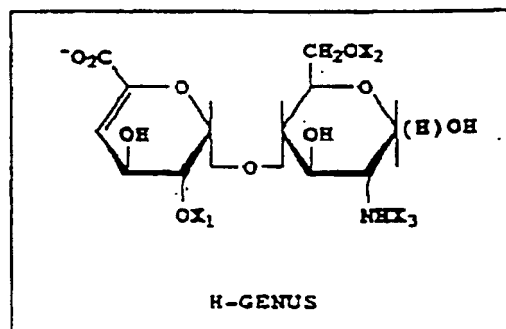


H-1145

11の二糖のうち、1つが実験的DTH反応の効果を促進した。この化合物H-0895は以下の構造を有する。



したがって、阻害性化合物の構造特徴を表す一般式を提供することができる。  
この一般式 (H-GENUS) を以下に示す。



(式中、 $X_1$ はHまたは $\text{SO}_3^-$ であり； $X_2$ はHまたは $\text{SO}_3^-$ であり；そして $X_3$ は $\text{SO}_3^-$ または $\text{COCH}_3$ である、ただし、 $X_3$ が $\text{SO}_3^-$ の場合には $X_1$ または $X_2$ の少なくとも1つが $\text{SO}_3^-$ であり、また $X_3$ が $\text{COCH}_3$ の場合には $X_1$ および $X_2$ の両方が $\text{SO}_3^-$ であ

る)。かなり広い有効投与量窓をもつ化合物という点においては、 $X_1$ は好ましくは $\text{SO}_3^-$ であり、 $X_2$ は好ましくはHであり、そして $X_3$ は好ましくは $\text{SO}_3^-$ である（すなわち、H-9392は最も広い有効阻害投与量の窓をもつ）。

上記の結果から、阻害という点からは、グルコサミン窒素における好ましい置換基は硫酸基である。グリコサミンの2-N位( $X_3$ )に硫酸基が存在する場合には、イズロン酸残基の2-位またはグリコサミンの6-位のいずれかに硫酸基を1個のみもつときに阻害活性が観察される。これらのヒドロキシ位の両方にさらに2個の硫酸基が存在しても活性をもつが、追加の硫酸基が全くない場合(H-1145などのように)には“ニュートラル”化合物となる。

これとは対照的に、グルコサミンの2-位にアセチル基を導入するには、イズロン酸の2-位( $X_1$ )とグルコサミンの6-位( $X_2$ )にそれぞれ1個ずつの2個追加の硫酸基が存在することを必要とする。H-9017、H-8892およびH-9142のすべての試験化合物が“ニュートラル”なものであったという事実によって証明されるように、グルコサミンの2-N位に置換基が何もない場合には正電荷のアモニウム基をもたらし、阻害効果を打ち消してしまう。イズロン酸の2-位またはグルコサミンの6-位に1個または2個の硫酸基が存在することは明瞭な効果を何も与えなかった。



最後に、 $X_3$ にアセチル基が存在し、かつ $X_1$ および $X_2$ に硫酸基が存在しない場合には、促進調節活性をもたらす（H-0895）。

二糖における負電荷の存在と、TNF- $\alpha$ 産生の阻害能との間には強い相関性があることに注目すべきである。正電荷のアンモニウム置換基の存在により“ニュートラル”な性質がもたらされるが、一方中性に荷電した化合物H-0895は活性TNF- $\alpha$ の産生を促進する。

表XXIIIB. 市販の二糖を用いるインビボDTH研究の結果から導かれる経験則

H-GENUS における $X_n$ の同定			
$X_3$	$X_2$	$X_1$	観察された活性
$SO_3^-$	$SO_3^-$	$SO_3^-$	阻害
$SO_3^-$	$SO_3^-$	H	阻害
$SO_3^-$	H	$SO_3^-$	阻害
$SO_3^-$	H	H	ニュートラル
$COCH_3$	$SO_3^-$	$SO_3^-$	阻害
$COCH_3$	$SO_3^-$	H	ニュートラル
$COCH_3$	H	$SO_3^-$	ニュートラル
$COCH_3$	H	H	促進
$H^{2+}$	$SO_3^-$	$SO_3^-$	ニュートラル
$H^{2+}$	$SO_3^-$	H	ニュートラル
$H^{2+}$	H	$SO_3^-$	ニュートラル

#### 6. 19. 2. 選択された単糖が活性TNF- $\alpha$ のインビボ産生を調節する能力についての結果

Sigma社から市販されている選択された単糖においてさらに実験を行い、その活性TNF- $\alpha$ のインビボ産生を調節する能力を試験した。前節で記載したのと本質的に同じ方法を用いて、1群6匹のCD1マウスに接種し、各種対照物

質および試験物質で処理し、試験動物の実験的DTH反応に及ぼす皮下注入された物質の効果を測定した。これらの実験の結果を以下の表に示す。

表XXIIIIC 種々の単糖類の皮下投与による、インビボでの追加のデータ

試験物質 ( $\mu\text{g/gm}$ ) <sup>-1</sup>	投与量 ( $\mu\text{g/gm}$ )	DTH ( $10^{-2}\text{mm}$ )	Inh <sub>max</sub> (%)	"R"値 % x
GlcN <sup>a</sup>	0.000012	5 $\pm$ 0.7 (19.7 $\pm$ 1.2)	75	6.25 x 10 <sup>6</sup>
	0.4	2.3 $\pm$ 0.9 (19.7 $\pm$ 1.2)	88	2.2 x 10 <sup>2</sup>
GlcN-2S <sup>b</sup>	N. E.			0
GlcN-3S <sup>c</sup>	N. E.			0
GlcN-6S <sup>d</sup>	N. E.			0
GlcN-2,3S <sup>e</sup>	0.0012	6.3 $\pm$ 1 (19.7 $\pm$ 1.2)	68	5.67 x 10 <sup>4</sup>
GlcN-2,6S <sup>f</sup>	1.2	7.7 $\pm$ 1 (19.7 $\pm$ 1.2)	61	5.08 x 10
NAc-GlcN <sup>g</sup>	N. E.			0
GalN <sup>h</sup>	0.00004	8.9 $\pm$ 0.6 (18.9 $\pm$ 0.7)	50	1.25 x 10 <sup>6</sup>
	0.12	6.5 $\pm$ 0.7 (18.9 $\pm$ 0.7)	67	5.58 x 10 <sup>2</sup>

<sup>a</sup> GlcN<sub>1</sub>は、グルコサミン即ち2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコースである。

対照の50%以上を阻害する2つの有効な投与量範囲、0.000004-0.0000

$4\mu\text{g/gm}$ 及び $0.004\text{--}4\mu\text{g/gm}$ が観察された。

<sup>b</sup> G1cN-2SはD-グルコサミン-2-N-スルフェートである。「N.E.」は、試験投与量範囲の $0.000004\text{--}4\mu\text{g/gm}$ マウスで効果が見られなかったことを示す。

<sup>c</sup> G1cN-3SはD-グルコサミン-3-スルフェートである。

<sup>d</sup> G1cN-6SはD-グルコサミン-6-スルフェートである。

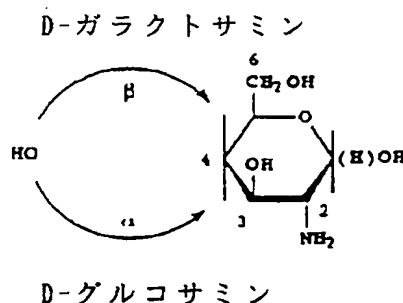
<sup>e</sup> G1cN-2,3SはD-グルコサミン-2,3-ジスルフェートである。対照の50%以上を阻害する有効な投与量範囲は狭いものであった。

<sup>f</sup> G1cN-2,6SはD-グルコサミン-2,6-ジスルフェートである。対照の50%以上を阻害する有効な投与量範囲は狭いものであった。

<sup>g</sup> NAc-G1cNはN-アセチルグルコサミンである。

<sup>h</sup> GalNはD-ガラクトサミンである。対照の50%以上を阻害する2つの有効な投与量範囲、 $0.00004\text{--}0.00012\mu\text{g/gm}$ 及び $0.04\text{--}0.4\mu\text{g/gm}$ が観察された。

下記に示したように、単糖の4-位置のヒドロキシルの立体化学により、糖がグルコサミン ( $\alpha$ -面) であるか、ガラクトサミン ( $\beta$ -面) であるかが決まる。



従って、単糖におけるN-アセチル化あるいは1つのスルフェートの存在は、マウスにおけるDTH反応を阻害するグルコサミンの能力を妨害するものと考えられる。

#### 6. 19. 3 選択した単糖類及び二糖類によるラットにおける

##### アジュバント関節炎 (AA) の治療

上記5. 7の項に記載したようにして、6~8週令の雌性LewisラットにおいてAAを誘発した。一群あたり5~10匹のラットの群を、実験的関節炎の誘発の1日前の皮下注射とその後に週1回の反復的な治療を施すことにより試験物質により治療した。効果がある場合は、5. 7の項に記載したようにスコアを付けた。

試験した3種の二糖類中、H-9392が、生理食塩水(0.1ml)のみを投与されたラットの対照群に対してAAスコアを低下させることにおいて最も顕著な効果を示した。図38に示したように、H-9392は120ng/ラットまたは0.6ng/ラットで投与され、誘発の24日後にAAの破壊的炎症を殆ど完全に(約90%まで)抑制し、H-1020は第24日において対照に対して約30%AAの進行を阻害した。これに対し、促進物質のH-0895は2種の投与レベル、0.1及び0.4ng/ラットにおいて誘発の約2週間以内にAA進行のレベルを増大させた。しかしこの効果は、その後に急速に消失し、第24日においてAAスコアは対照のレベルと実質的に変わらなくなった(図38A参照)。

一方、ある種の単糖類もこのラットモデルにおいてインビボにおける阻害効果を示すことが判明した。図38Bに示したように、

3種の投与量レベルにおけるグルコサミンの治療により、対照のレベルに対し、約60~80%AAの進行が阻害される。ガラクトサミンも阻害効果を示すが、グルコサミンにより示されるものよりもずっと低い程度のものである(図38C参照)。

最も興味深いのは、第0日(AA誘発の開始)または第12日(ラットはすでにAAに罹患している)に始めて、H-9392を週1回あるいは毎日投与した、H-9392を使用して行った別の実験において、全ての場合においてAAの重篤度の陽性の抑制が見られたことである。これらの実験の結果を図38D(週1回)及び38E(毎日)に示す。図38Dに示されるように、第12日に開始された、即ちラットが既にAAに罹患した後でも、H-9392の週1回の投与は、対照に対して少なくとも誘発の開始(第0日)における週1回の治療と同様に有効である。図38Eは、罹患したラットの毎日の治療は誘発の開始において始めた毎日の治療ほど有効ではないが、確立された関節炎を有するラットの毎日の治療は、AAのスコアを低下させることにおいて、対照群と比較してなおかなり有効であることを示している。

これらの結果は、本発明の物質が重篤な関節炎の進行を防止することだけでなく、確立された関節炎の治療においても有効であることを劇的に示している。さらに本研究は、従来開示されたLMMHは週1回投与された場合にのみ阻害特性を示すが、本発明の二糖類は週1回または毎日投与されたときに有用な阻害活性を示

することができることを明らかにするものである。

実験的に誘発されたAAの治療における本発明の化合物の優位性をさらに明らかにするものとして、Lewisラットの群（1群あた

り5匹のラット）をリン酸デキサメタゾン（Sigmaより購入、公知の抗炎症剤）または前記二糖9392を皮下注射することにより治療する、別の一連の比較実験を行った。治療はアジュバント関節炎（AA）疾患の誘発の12日後に開始し、2種の治療法によるものであった。最初のものは、前記の公知の抗炎症薬を毎日注射するものであり、2番目のものは前記の公知の抗炎症薬または前記の二糖を週1回注射するものであった。全ての場合において、0.1mlのリン酸バッファー溶液中の100 $\mu$ gの公知の抗炎症薬をそれぞれのラットに投与し、ラットあたりやはり0.1mlのリン酸バッファー溶液中の120ngの前記二糖を投与した。対照として1群のラットに0.1mlのリン酸バッファー溶液のみを注射した。公知の抗炎症薬の毎日投与法については、誘発後第17日の後に治療を終了し、公知の抗炎症薬または前記二糖の週1回の投与レジメについては、誘発後第26日の後に治療を終了した。

上記の実験の結果を図38F及び38Gに示す。図38Fを参照すると、二糖9392の週1回の投与が、治療の最初のほぼ1週の間のリン酸デキサメタゾンの毎日の投与に十分匹敵するものであることが判る。しかし、治療の終了の後（第26日）、毎日リン酸デキサメタゾンを投与されたラットの群では再発が見られるのに対し、前記二糖群では改善が続いたことに注意されたい。AAの誘発後第30日において、二糖群はリン酸デキサメタゾン群よりも良好な状態となった。

さらに、図38Gに示されるように、週1回のリン酸デキサメタゾンと週1回の二糖9392の有効性を比較すれば、AAの誘発後第30日目において、リン酸デキサメタゾンの週1回の投与はAAスコア

の重篤度の中程度の減少をもたらしたにすぎないことが判る。これに対し、二糖9392の週1回の投与はAA誘発後第30日目において、実験的に誘発されたアジュバント関節炎の殆ど完全な抑制を生じた。やはり特に指摘されるのは、リン酸デキサメタゾンについては週1回の治療の終了後にラットにアジュバント関節炎の再

発が見られたことである。ところが先に記載した通り、二糖9392により治療されたラットは二糖の投与をやめた後にも改善され続けた。

このように、二糖9392の週1回の投与は、長期間にわたるリン酸デキサメタゾンの毎日または週1回の投与に対し明らかに優れている。リン酸デキサメタゾンにより毎日あるいは週1回治療されたラットでは治療の終了後に疾患の再発が見られたのに対し、二糖で治療されたラットは改善されたAAスコアを示し続け、継続する疾患の治療後阻害を反映していた。

#### 6. 19. 4. ラット角膜のリポ多糖 (L P S) - 誘導炎症に関する

##### 実験結果

角膜のL P S - 誘導炎症は、オランダのVanderhagen, C. 及びその共同研究者の研究であって、刊行のために提出された”ラットのエンドトキシン-誘導ブドウ膜炎における眼内T N F 及びI L - 6 の速度論 (Kinetics of Intraocular TNF and IL-6 in Endotoxin-Induced Uveitis in the Rat)” に示されているように、T N F 依存性である。30-ゲージ針を用いて、L P S (5 ng) をルイスラットの角膜に注射した。1日後、ラットを1群につき2匹 (つまり1群につき4眼) の群に分けて、次いでリン酸緩衝生理食塩水 (0.05ml) 又はH-1020 (50ng/ラット又は200ng/ラットのいずれかの投与量で) を皮下注射した。その効果は、もしある場合は、下記のように得点をつけて、その得点の合計を総合点として用いた：

浮腫	0 - 3 点
新血管新生	0 - 3 点
赤み	1 / 0 点
腫張	1 / 0 点
出血	1 / 0 点
縮瞳	1 / 0 点
癒着	1 / 0 点 (水晶体又は角膜に付着した虹彩)
前房蓄膿	1 / 0 点 (前眼房の膿又は血液)
角膜の濁り (hazy cornea)	1 / 0 点

その結果のグラフ表示 (図39) からわかるように、投与量 50ng

／ラットでは、対照と比較して局所的 L P S -誘導炎症の作用を抑制するのに有効であった。興味深いことに、投与量 200ng／ラットでは、有意な効果を得ることはできなかった。

#### 6. 19. 5. ラットにおけるリポ多糖 (L P S) -誘導ブドウ膜炎

##### に関する実験結果

ブドウ膜炎は、全身に投与された L P S に応答した眼の前眼房の炎症である。前節において L P S の局所的投与により生じた炎症と同様にブドウ膜炎は T N F 依存性である。本実験においては、1日目に8~10週齢、1群当たり8眼のレイスラット群を H-9392 (32ng／ラット又は500ng／ラットの投与量) 又は生理食塩水 (0.1ml) のいずれかで処理した。2日目に L P S の 2 mg／ml 溶液 (50 $\mu$ l) をそれぞれの足蹠に注射した；各ラットは全部で L P S 200 $\mu$ g が与えられた。3日目にそれぞれの眼を穿刺して、全タンパク質の濃度を炎症の程度の定量アッセイとして測定した。これらの実験の結果を早速下記に示す。

##### タンパク質中間値

ラット	処 理	(mg/ml)
無 LPS	—	0.36
LPS	生理食塩水	18.4
LPS	32 ng H-9392	5.2
LPS	500ng H-9392	4.8

このように、H-9392の単独投与は、いずれの投与量においても、ラットにおける L P S 全身投与により生じた炎症を対照と比較して約70%以上抑制するのに有効であった。

#### 6. 19. 6. 選択された物質の放射線防護効果に関する実験結果

8週齢、1群当たり5~10匹の雌BALB/cマウス群に、生理食塩水 (0.1ml、対照)、H-9392 (30ng／マウス)、又はグルコサミン (10,000ng／マウス) のいずれ

かを、照射前日と30日目の実験の終了時まで週1回皮下注射した。全てのマウスを $^{60}\text{Co}$ ガンマ線源を用いて700ラドの線量で照射した。

次に、異なるマウス群内の死亡率を30日間にわたって記録した。その結果、生理食塩水のみを与えられたマウスは30日までに死亡率100%になることが示されたが、H-9392で前処理されたマウスは同じ期間内で死亡率がわずか40%であることが示された。また、グルコサミンを注射されたマウス群も、対照群よりも良い結果を出し、同じ期間で死亡率20%であることが示された。

従って、本発明の試験物質による前処理は、その前処理されたマウスが通常であれば30日以内に群として死亡率100%になる放射線照射に耐えて生き残ることを可能にした。

別の実験において、BALB/Cマウス群（1群につき5匹）を、照射前日、照射後6日目、及び照射後13日目にもう1回だけ、試験物質（マウス当たり0.1mlの生理食塩水；0.3, 3, 30及び300ng/マウスのH-9392；及び1, 10及び100 $\mu\text{g}$ /マウスのグルコサミン）で処理した以外は同様にして該マウス群を750ラドのガン

マ線に曝した。全ての処理を3番目、即ち最後の投与後に止めた。この実験の結果を図39X（生理食塩水及びグルコサミン）及び39Y（生理食塩水及びH-9392）に図示しており、対照群における全ての動物は照射後22日までに死亡しているが、30ng H-9392群においては1匹のマウスのみが照射後30日までに死亡したことが示されている。300ng H-9392及び1 $\mu\text{g}$  グルコサミン処理養生は、照射後の死亡率の抑制において中程度の活性を示した。

従って、これらの結果は、この興味のある物質をガン治療において使用する可能性を示す。癌治療における放射線治療に伴う毒性は、本発明の化合物の前投与により劇的に低減し得る。このアプローチは、恐らく、毒性の副作用を認めることなしに、放射線の線量をより高い効果的なレベルに増加することを可能にする。上記の実験によって例証したように、本発明の化合物は、処理が二糖の3回投与に制限される場合でさえ、一定のかなり低い投与量で非常に有効である。

6. 19. 7. 選択された物質の同種異系移植片拒絶反応を抑制する

能力

---



また、H-9392の効果も、マウスの皮膚移植片拒絶反応実験において試験した。特に、C57BL/6供与マウス (H-2<sup>b</sup>) 由来の皮膚移植片を、Baharav, E. ら、J. Immunol. Methods (1986) 90: 143-144にしたがって受容BALB/Cマウス (H-2<sup>d</sup>) に適用した。拒絶反応までの日数を移植片の脱落により測定した。拒絶反応までの日数を、対照群 (生理食塩水のみを0.1ml注射したもの) と、H-9392を3 ng又は300ngの用量で移植前日及びその後週1回皮下注射し

た試験群とについて測定した。その結果は、図40及び40Aにグラフにして図示しており、3 ng/マウスの投与量は、皮膚移植片拒絶反応50%レベルに達するのを5日遅らせるということが明らかになった！しかしながら、同じ化合物でも300ng/マウスで投与した場合、対照と比較して50%拒絶反応で有意差を生ずることはできなかった。これらの結果は、完全に同種異系の皮膚移植片の拒絶反応が公知の最も強力な免疫応答の一つであると認められるので、非常に重要である。

#### 6. 19. 8. 選択された物質のNODマウスにおいてIDDMの発症を抑制する能力

NODマウスはヒト糖尿病タイプIの忠実なモデルとして役に立つことがよく知られている。実際、我々のコロニーの全ての雌NODマウスは約4～5月齢内に自然発生的に糖尿病を発症する。タイプI糖尿病又はインシュリン依存性糖尿病 (IDDM) は、自己反応性T細胞により引き起こされ得る自己免疫疾患と認められるので、本発明の選択された化合物を、このT細胞-仲介自己免疫反応を調節する能力について試験した。

したがって、1群当たり6～12匹の雌NODマウス群を、生理食塩水 (0.1ml)、H-9392 (30ng/マウス)、又はグルコサミン (10,000ng/マウス) を皮下注射することにより処理した。全てのマウスは約3.5月齢であり、これは図41に示したように、1群としてのマウスは既に20%のIDDM発症率をこうむっていることを意味している。IDDMの発症率はマウスの血液中のグルコースレベルによって測定することができる。糖尿病でないマウスは、血液中の

平均グルコースレベルは約 $140 \pm 10 \text{ mg/ml}$ である。マウスは、その血液グルコー

スレベルが $200\text{mg}/\text{ml}$ 以上（即ち、「正常な」レベルの標準偏差の約3倍以上）である場合、糖尿病であるとみなされる。より便利のように、グルコース尿レベルをClnstix<sup>TM</sup>ディップスティック（Ames）を用いて測定した。この試験は0から+3の得点を与え、糖尿病の陽性兆候と理解される二つの別個な兆候がある場合においては+2以上の得点を与えた。

したがって、全ての対照マウスは糖尿病であるとみなされた4.5月において、グルコサミン-処理マウスは約65%のみが糖尿病になり、H-9392-処理マウスの中ではその疾患にかかったのが50%未満であったほど、H-9392及びグルコサミンの両方が、糖尿病の発症を抑制することが分かったことは非常に驚くべきことであった。

別の方法をみると、図41Aは5月齢までに全ての対照マウスが糖尿病症状で死んだことが示されている。それと対照的に、グルコサミン $10,000\text{ng}$ で処理したマウスは約半分のみが同じ時間枠内に死んだ。全く印象的なことに、H-9392  $30\text{ng}$ で処理したマウスはどれも同じ時間枠内に死ななかった；すなわち、H-9392の結果についてのプロットはX軸と一致している。

#### 6. 19. 9. 内皮細胞（EC）による、付着分子、ICAM-1及びELAM-1 のTNF- $\alpha$ -誘導発現における選択された二糖の効果

ICAM-1及びELAM-1などの付着分子は、炎症応答に関与する白血球の認識及びそれに続く「ローリング」（即ち、内皮への付着及び内皮を貫通した移入）において重要である。活性TNF- $\alpha$ への応

答において、内皮細胞（EC）はICAM-1及びELAM-1を発現する。したがって、TNF- $\alpha$ は白血球付着及び移入についてのシグナルをアップレギュレートすることにより炎症を増大させることができる。ECによるICAM-1及びELAM-1のTNF- $\alpha$ -誘導発現における本発明の二糖の効果を測定するために、以下の実験を行った。

新たに単離したヒト臍静脈ECを、10% FCS、8% ヒト血清、抗生物質及び内皮細胞増殖因子（EC-QM; Sigma, St. Louis, MO） $50\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えたM-199（Gibco Laboratories）中で増殖させた。ECは、EC-QM培地（ $3.5 \times 10^5$  細胞/ $\text{ml}$ ） $0.1\text{ml}$ を平底の96-ウェルプレート（Nunk Roskilde, Denmark）に添加することに

よって接種した。

集密的な単層培養物を洗浄し、M-199  $50\mu\text{l}$  中、 $37^\circ\text{C}$  で1時間、種々の濃度の選択された二糖化合物とともにインキュベートした。次いで、その化合物を洗い流し、培養物を、EC-QM中で200IU/mlの前もって調製したTNF- $\alpha$ とともに一晩インキュベートした。次に、細胞を1%FCSを含むHank's溶液 (Hank's 1%) で、 $37^\circ\text{C}$  で3回洗浄し、PBS中で2%グルタルアルデヒドを用いて固定した。続いて、細胞をHank's 1%で3回洗浄して、2.5%BSAを用いてPBS中にブロックし、再度Hank's 1%で2回洗浄した。抗-ICAM-1及びELAM-1 mAb (Genzyme, Cambridge MA; PBSで1/1000に希釈した) を、 $22^\circ\text{C}$  で1時間、上記細胞とともにインキュベートし、次いで、Hank's 1%で3回洗浄した。ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスAb Sigma、1/1000希釈) を細胞とともに1時間インキュベートして、続いて、洗浄した。o-フェニレンジアミン塩酸塩タブレットを水に溶解することによって調製したo-フェ

ニレンジアミン (OPD) (OPDはペルオキシダーゼの基質であり、Sigmaより入手可能である, Cat. No. p9187) を加えた後、492nmの吸光度をELISAリーダーで検出した。試料を三回繰り返し検定し、少なくとも三つの別個のアッセイの平均値を計算した。

表XXIIDD. 前もって調製されたTNF- $\alpha$ に应答しての、内皮細胞による付着分子の発現に対する二糖の効果

ECのTNF- $\alpha$ 処理	阻害化合物 [pg/ml]	組換えヒトTNF- $\alpha$ 誘導 付着分子(0. D. 492)* :	
無	無	0.12 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01
有	無	1.2 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.2
有	9392 [50]	0.6 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.04
有	9392 [100]	0.9 $\pm$ 0.07	1.4 $\pm$ 0.03
有	1020 [50]	0.7 $\pm$ 0.05	1.2 $\pm$ 0.1
有	1020 [100]	0.9 $\pm$ 0.03	1.5 $\pm$ 0.07

\* ELISA による特異的モノクローナル抗体との結合により検出した ELAM-1及びICAM-1の発現

上記の実験は、ECを、二糖化合物9392及び1020で前処理すると、前もって調製されたTNF- $\alpha$ に対して有意な耐性を持つECを与えることを示している。したがって、TNF- $\alpha$ により誘導される

ECの付着分子発現のアップレギュレーションは、50%まで抑制された。これらの結果は、本発明の化合物はTNF- $\alpha$ の標的細胞（例えば、EC）、及びTNF- $\alpha$ を産生する細胞（例えば、T細胞、マクロファージ）に影響を与えて、活性TNF- $\alpha$ の産生のみならず、TNF- $\alpha$ に应答する標的細胞の性質（即ち、サイトカインの抹消受容の調節）をも阻害することができることを意味する。そこで、一定の疾患状態は、活性化T細胞及びマクロファージにより開始される細胞-誘導炎症応答に対するある種の耐性を、TNF- $\alpha$ の標的細胞に付与することによって、本発明の物質の投与から利益を得ることができる。

6. 19. 10. ラットにおける実験的アレルギー性喘息の徴候を抑制

### する物質H-9392の能力

実験的アレルギー性気管支喘息は免疫され、次いでエアゾール溶液中の初回免疫抗原の吸入によって再度抗原投与されたラットにおける即時型過敏性反応である。(Edelman, et al., Am. Rev. Resp. Dis. (1988) 137:1033-37)。かかる実験的疾患の病因学及び病態生理学は、自然に発生するヒトにおける対応物にきわめて近似している。

物質H-9392の気管支喘息発作を防ぐ能力を評価するために、6匹の雄Brown Norwayラットを、0日目に0.9%生理食塩水1ml当たり200mgのA10Hを含む懸濁液中のオボアルブミン1mgを皮下注射することによってオボアルブミン(OVA)で感作して、次いで加熱死菌ボルデテラ・ペルツシス(*Bordetella pertussis*)細菌(Pasteur Merieux, S.V.)を $6 \times 10^6$ 個含む溶液1mlの腹腔内注射

した。それに続く抗原投与は、空気流量6 L/minで運転されるDevilbiss Nebulizer中でエアロゾル化したOVA(1mg/ml溶液)を5分間吸入することからなった。呼吸窮迫(RD)応答を、窮迫の徴候がない場合は段階0；頻呼吸の場合は段階1；中等度の苦しい息づかいの場合は段階2；口を開けた状態の激しい息づかいの場合は段階3；意識の喪失及び筋肉緊張の場合は段階4として評価した。一次免疫感作後16日目に、全ての動物に最初のアロゾル化抗原投与を行って正の制御をもたらした。観察者が被験動物の病歴をわからないようにするために、それらの動物をコード化した。全てのラットをOVAに感受性で、喘息を全ての動物に等しく誘導した。

30日目に、動物を二つの群に分けて、生理食塩水(対照群A)又は物質H-9392、皮下30ng(B群)のいずれかを与えて、上記と同様に35日目に抗原投与した。その結果を図42に示す。図42に示したように、30日目に生理食塩水のみを与えられた動物は、段階3又は4の呼吸窮迫を経験した。物質H-9392で処理した動物は、頻呼吸を示したにすぎなかった。示された結果から、過敏症が確認された動物への(第二の抗原投与の5日前の)物質H-9392の投与は、喘息発作を遮断することがわかる。

6. 20. 市販のヘパリン由来のオリゴ糖についての *in vitro*ヒトPBLバイオアッセイの結果

市販のヘパリン由来の二糖類及び分子量 1,800-18,000 の範囲の多糖類について、生物学的活性の試験を行った。結果を表XXIIIに示す。このデータから明らかなように、試験した全ての試料は、一つを除いて効果が全くないか又は一致しない効果を示した。表の脚注に説明するように、特定の試験材料についての試験結果は、3つのバイオアッセイの実施の全てにおいて同じ性質の結果が得られなかった場合に「不一致」と示した。(バイオアッセイの結果を提示する、この開示に含まれる全ての表におけるそれぞれの試験材料は、少なくとも3つの試験の材料とした。ヒトPBLバイオアッセイにおいて、各回の実施では、異なる個体から得られた血液を使用した。)

表XXIII. ヒトPBLバイオアッセイを使用した、活性TNFの分泌に及ぼす市販のヘパリン二糖類の効果

試験材料 <sup>a</sup>	濃度 (pg/ml)	TNF 活性の バイオアッセイ (%)	“R” 値 % x (pg/ml) <sup>-1</sup>
H 9517	b	不一致 <sup>c</sup>	—
H 8642	b	不一致	—
H 8767	b	不一致	—
H 0895	b	不一致	—
H 8892	b	効果なし	0
H 9017	b	効果なし	0
H 9142	b	不一致	—
H 9267	b	不一致	—
H 1020	l	25%~35%	25~35
H 9392	b	不一致	—
MW 1,800 <sup>d</sup>	e	不一致	—
MW 2,400	e	不一致	—
MW 3,000	e	不一致	—
MW 3,600	e	不一致	—
MW 4,200	e	不一致	—
MW 4,800	e	不一致	—
MW 5,400	e	効果なし	0
MW 6,000	e	効果なし	0
MW 9,000	e	効果なし	0
MW 16,000	e	不一致	—
MW 18,000	e	不一致	—

a Sigma Chemical社の製品カタログ (1992) 中で見出せる製品番号

b 濃度範囲 1 µg/ml - 0.01 pg/ml

c 3つの独立した個体から得られるPBLを使用した3つのバイオアッセイを

それぞれの試験材料について行った。どの試験材料についての試験結果も、同じ結果が（即ち、阻害、促進、又は効果なし）3つのバイオアッセイ全てで得られなければ「不一致」と示した。

d Serbio製品カタログ（1991年12月26日）に記載される、種々のヘパリンオリゴ糖断片の分子量の表示

e 濃度範囲  $1 \mu\text{g}/\text{ml} - 0.01 \text{pg}/\text{ml}$

6. 21. mAbに基づくアッセイキットに対する *in vitro* ヒ

#### トPBLバイオアッセイの結果

ここに記載したインビトロでのヒトPBLバイオアッセイで得られた活性データと、通常のモノクローナル抗体に基づくアッセイキットの結果を比較すると、「活性」TNFとしてヒトPBLバイオアッセイにより検出される量よりも、より多くのタンパク質が試験した培地中に存在することが分かる。この結果を表XXIVに示す。例えば、「対照」レベルでのT細胞より産生されるタンパク質の量（約274 pg/ml）とフラグミンHPLC-F16が存在するときのタンパク質の量（約200 pg/ml）との差異は、同じサンプルに対するヒトPBLアッセイによって検出される活性の差異（活性の100%変化）ほどには劇的でない。それゆえ、これらの結果から以下のことが結論付けられる。即ち、活性化免疫エフェクター細胞は、有意量のTNFタンパク質を分泌しうるが、本発明の活性物質の存在下でさえも、分泌タンパク質の僅かな割合のみが、TNF感受性細胞を死滅するのに十分な活性を有する。この結論は、TNFが活性型と不活性型の両方の型で産生されるという意見を支持する。

表 XXIV

mAbイムノアッセイキットにより検出されたタンパク質の量  
に対するヒトPBLバイオアッセイにより検出されたTNF活性  
の比較

試験材料		TNF活性の バイオアッセイ (死滅%)		mAbアッセイキットの TNF (pg/ml)
なし	45	対照	273.9	対照
フラグミン				
HPLC-F1	72	Aug <sub>max</sub> (60%)	284.5	Aug <sub>max</sub> (3.8%)
HPLC-F3	13.5	Inh <sub>max</sub> (70%)	224	Inh <sub>max</sub> (17.9%)
HPLC-F16	0	Inh <sub>max</sub> (100%)	199	Inh <sub>max</sub> (27%)
DECM				
HPLC-F10	18	Inh <sub>max</sub> (60%)	225	Inh <sub>max</sub> (17.5%)
HPLC-F14	13.5	Inh <sub>max</sub> (70%)	232	Inh <sub>max</sub> (15%)
HPLC-F25	63	Aug <sub>max</sub> (40%)	292	Aug <sub>max</sub> (6.5%)
HPLC-F37	90	Aug <sub>max</sub> (100%)	301	Aug <sub>max</sub> (10%)

#### 6. 2.2. ECM由来の二糖の構造的特徴の予備研究結果

上述したように、HPLCIIクロマトグラフィー (図23) 及び脱塩を行った後、ECM由来の二糖の試料20  $\mu$ g得た。その後のSAX-HPLC条件下での精製は、上記試料が90%以上の純度になったことを示す (図24, 23. 10分におけるピークA23/4)。しかしながら、この試料のプロトンNMRスペクトル (図31) は、繰り返しの脂肪族-CH<sub>2</sub>-部分を有する汚染物質が存在することを示した。それにもかかわらず、in vitro及びin vivoのバイオアッセイ条件下で阻害について陽性の試験が示されたことから、SAX-HPLC精製に留意することは重要である。

プロトンNMRスペクトルは、23℃、500MHzにおいて、D<sub>2</sub>O中で記録された。2次元COSYスペクトルも同様に記録された。最後のマトリックスのサイズは、512×512、予備飽和N-COSY、1536スキャンであった (図32)。典型的な糖のシグナルが、1次元及び2次元スペクトルの両者における3-5.5 ppmの間にはっきりと現れている。また、3ヘルツのカップ



リングファクターを有するアノマープロトンのダブレットシグナルが、5.39 ppmに見られ(図33)、 $\alpha$ 配置のグルコサミン糖単位の存在と一致する。

アノマープロトンのケミカルシフトを、胎盤ヘパラーゼの $\beta$ -グルクロニド特異性であると考えられるものと一緒に合わせると、その二糖は還元末端のグルクロン酸残基に1 $\rightarrow$ 4結合された $\alpha$ 配置の非還元末端のグルコサミンを有すると推論される。さらに、6 ppmにシグナルが存在しないことは、その二糖が飽和している(即ち、グルコサミン残基のC<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>に二重結合がない)ことを示している。このように、ヘパラーゼはエリミナーゼ(eliminase)ではなく、明らかにヒドロラーゼ(加水分解酵素)である。

FTIRスペクトルは、透過型フィルム検出器を装備したMattson Galaxy 6020によって記録した(2 cm<sup>-1</sup>の分解能のDTGS; ZnSe窓を用いた128スキャン)。図34-35は、硫酸化された化合物及び部分的に脱硫酸化された類似化合物の存在をそれぞれ示している。図34は、特に3500-3000(カルボキシル基及び水酸基に特徴的)、1594(カルボニル基)、1394、1121、1107、1074、1005、993、

936及び852 cm<sup>-1</sup>における吸収を示しており、少なくともそれらのうちいくつか、特に最後の吸収は、硫酸基に関係していることを示している。

一部の硫酸基を失ったと考えられるメチル誘導体のマススペクトルは、Jeol JMS HX/110A FABによって得られた。E = 6 kVにおいてキセノンビームが使用され、電流は10 mAであり、加速電圧は10 kVであった。最初に、メチル誘導体は酸性の媒体中でジアゾメタンを用いてオリゴ糖の試料を処理することにより調製した。メチル化された生成物は、次に酢酸エチルで抽出した。M/Z (M + H<sup>+</sup>) = 531を有する特有のイオンが、バックグラウンド上で観察された。かくして、このデータは、メチル誘導体の分子量約530と一致していると考えられる。この結果を確かめるために、2つの異なるマトリックスを使用した(DT T: チオグリセロール(1:1)及びメチルニトロベンジルアルコール、各々図36A-B及び図37A-B)。「A」スペクトルは試料+マトリックスに相当し、「B」スペクトルは特定のマトリックスのみに関連する。

これらのマススペクトルのデータに基づいて、メチル化された（部分的に脱硫酸化された）誘導体の推定化学構造式を提案することができる。:  $C_{13}H_{23}NO_{17}S_2$ , MW=529.47.

以下の実験手順によって、4-O-（2-デオキシ-6-O-スルホ-2-スルホアミノ- $\alpha$ -D-グルコピラノシル）-（2-O-スルホ- $\beta$ -D-グルコピラノシド）ウロン酸が合成される。

6. 23. 4-O-（2-デオキシ-6-O-スルホ-2-スルホアミノ- $\alpha$ -D-グルコピラノシル）-（2-O-スルホ- $\beta$ -D-グルコピラノシド）ウロン酸  
の合成

6. 23. 1. 6-O-アセチル-2-アジド-3, 5-ジ-  
O-ベンジル-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコ  
ピラノシルクロライドの調製

Cernyらの方法 (Cerny et al. (1961) Coll. Czech. Chem. Cos. 25:2547) によって、1, 6-アンヒドロ- $\mu$ -D-グルコピラノース [1] から 2-O-トシル-1, 6:3, 4-ジアンヒドロ- $\beta$ -D-ガラクトピラノース [2] を製造する。2-O-トシル-1, 6-アンヒドロ- $\beta$ -D-グルコピラノース [3] は、Cernyらの方法 (Cerny et al. (1965), Coll. Czech. Chem. Soc. 30:1151) によって、2-O-トシル-1, 6:3, 4-ジアンヒドロ- $\beta$ -D-ガラクトピラノース [2] から製造する。

1, 6:2, 4-ジアンヒドロ- $\beta$ -D-マンノピラノース [4] は、StanekとCernyの方法 (Stanek and Cerny (1972) SYNTHESIS p. 698) によって、2-O-トシル-1, 6-アンヒドロ- $\beta$ -D-グルコピラノース [3] から製造する。6-O-アセチル-2-アジド-3, 4-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ- $\beta$ -D-グ

ルコピラノシルクロライド [A] は、Paulsen及びSlenzeiの方法

(Paulsen and Slenzel (1978) Chem. Ber. 111:2334) によって、1, 6:2, 3-ジアンヒドロ- $\beta$ -D-マンノピラノース〔4〕から製造する。

6. 23. 2. メチルー (ベンジル-2-O-アセチル-3-O-ベンジル- $\beta$  及び  $\alpha$ -L-グルコピラノシド) -ウロネートの調製

Stevensの方法 (Stevens (1978), Methods Carbohydr. Chem. 6:124) によって、D-グルコース〔5〕から1, 2:5, 6-ジ-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-グルコフラノース〔6〕を製造する。3-O-ベンジル-1, 2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-グルコフラノース〔7〕は、Whistler及びLakeの方法 (Whistler and Lake (1972), Methods Carbohydr. Chem. 6:286) によって、1, 2:5, 6-ジ-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-グルコフラノース〔6〕から製造する。

メチルー (ベンジル-2-O-アセチル-3-O-ベンジル- $\beta$  及び  $\alpha$ -L-グルコピラノシド) -ウロネートは、Jacquinetらの方法 (Jacquinet et al. (1984), Carbohydr. Res. 130:221) によって、3-O-ベンジル-1, 2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-グルコフラノース〔7〕から製造する。

6. 23. 3. 6. 23. 1の生成物と6. 23. 2. の生成物の縮合

上記第6. 23. 1節における生成物と第6. 23. 2節における生成物のカップリングは、Jacquinetらの方法 (Jacquinet et al. (1988), Carbohydr. Res. 174:253) によって行った。O-脱アセチル化、加水分解、O-硫酸化、還元及び脱ベンジル化は、Jacquinetらの方法 ((1984), 前述) によって行い、4-O- (2-デオキシ-6-O-スルホ-2-スルホアミノ- $\alpha$ -D-グルコピラノシル) - (2-O-スルホ- $\beta$ -D-グルコピラノシド) ウロン酸を得、それをさらにR

iceらの方法(Rice et al. (1985), Anal. Biochem. 150:325)によってSAX-HPLCで精製する。この生成物の構造を図43に示す。それは、ここに記載される他の化合物と同じ生物学的活性を有すると考えられる。

本明細書に明確に開示されていない他の化合物及び方法であっても、それが本発明に含まれ得ることは、当業者にとって明白なことである。このような他の化合物及び方法は、本発明の範囲及び意図するところに含まれると考えられる。従って、本発明は、ここに開示される特定の実施例の記載には限定されないが、以下の請求の範囲のみに限定される。

ここに示される全ての引用文献の開示は、引用によってそれらの全体が本明細書に包含される。

【図1】

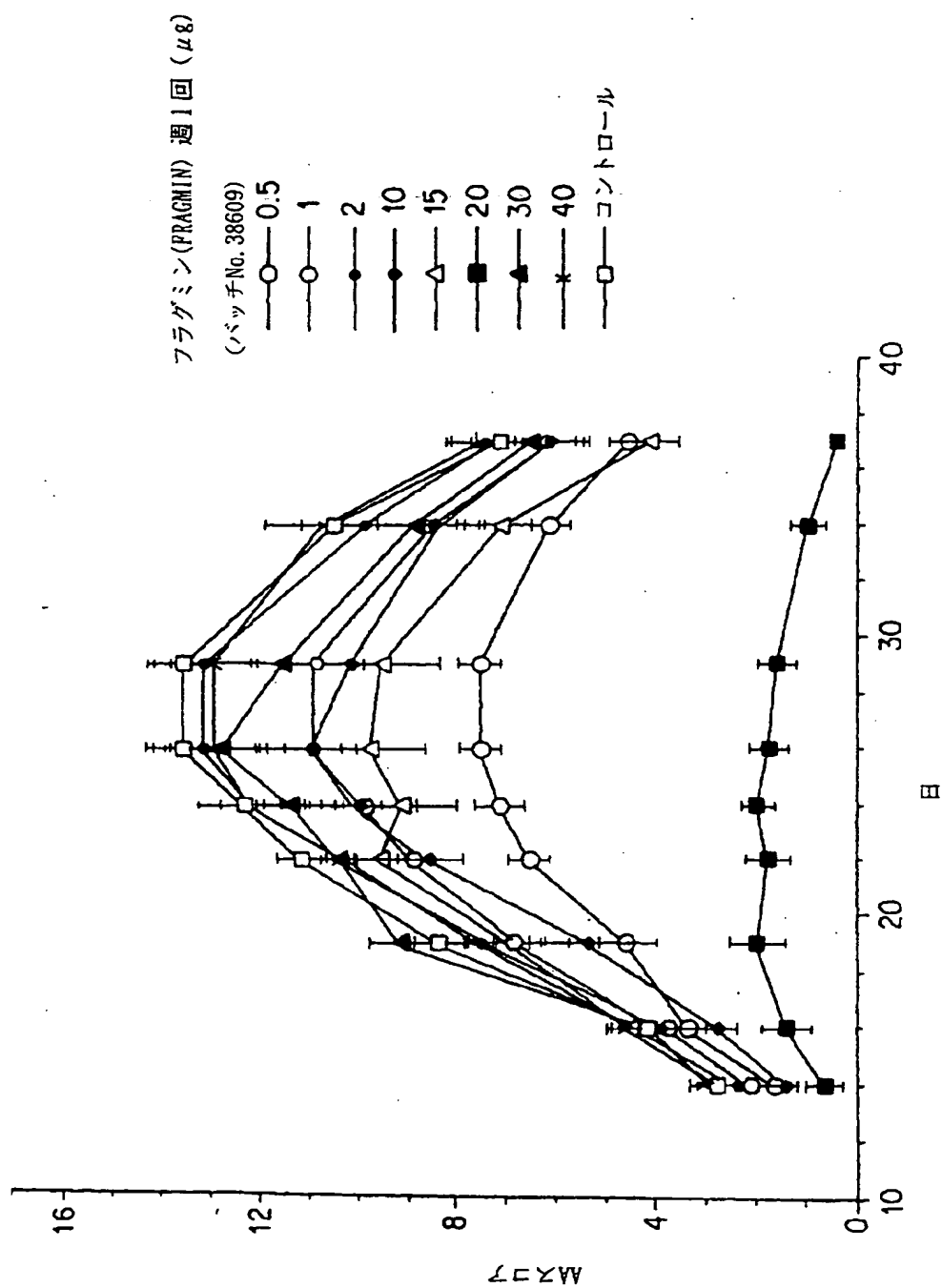


FIG. 1

【図2】

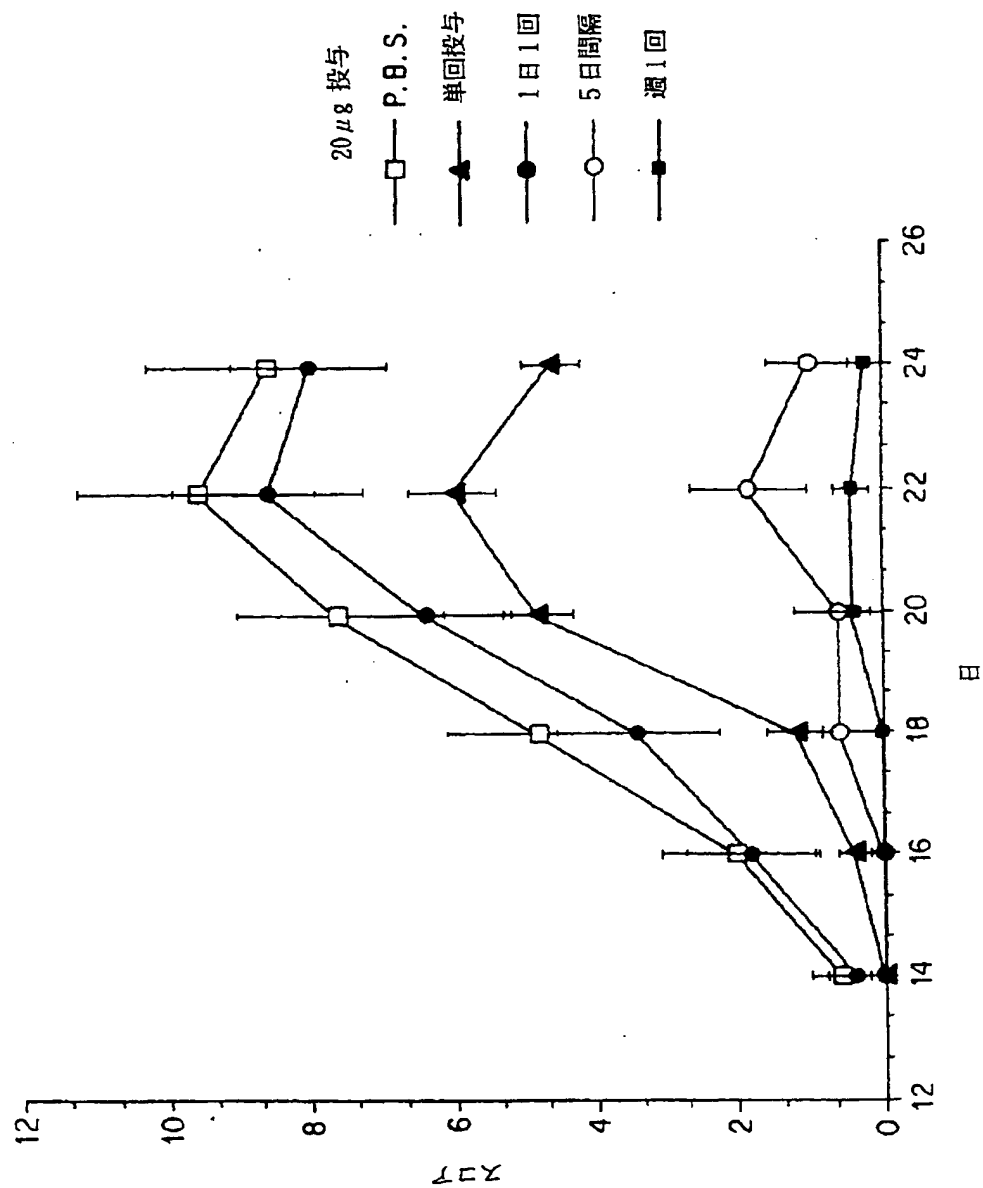


FIG. 2

【図 3】

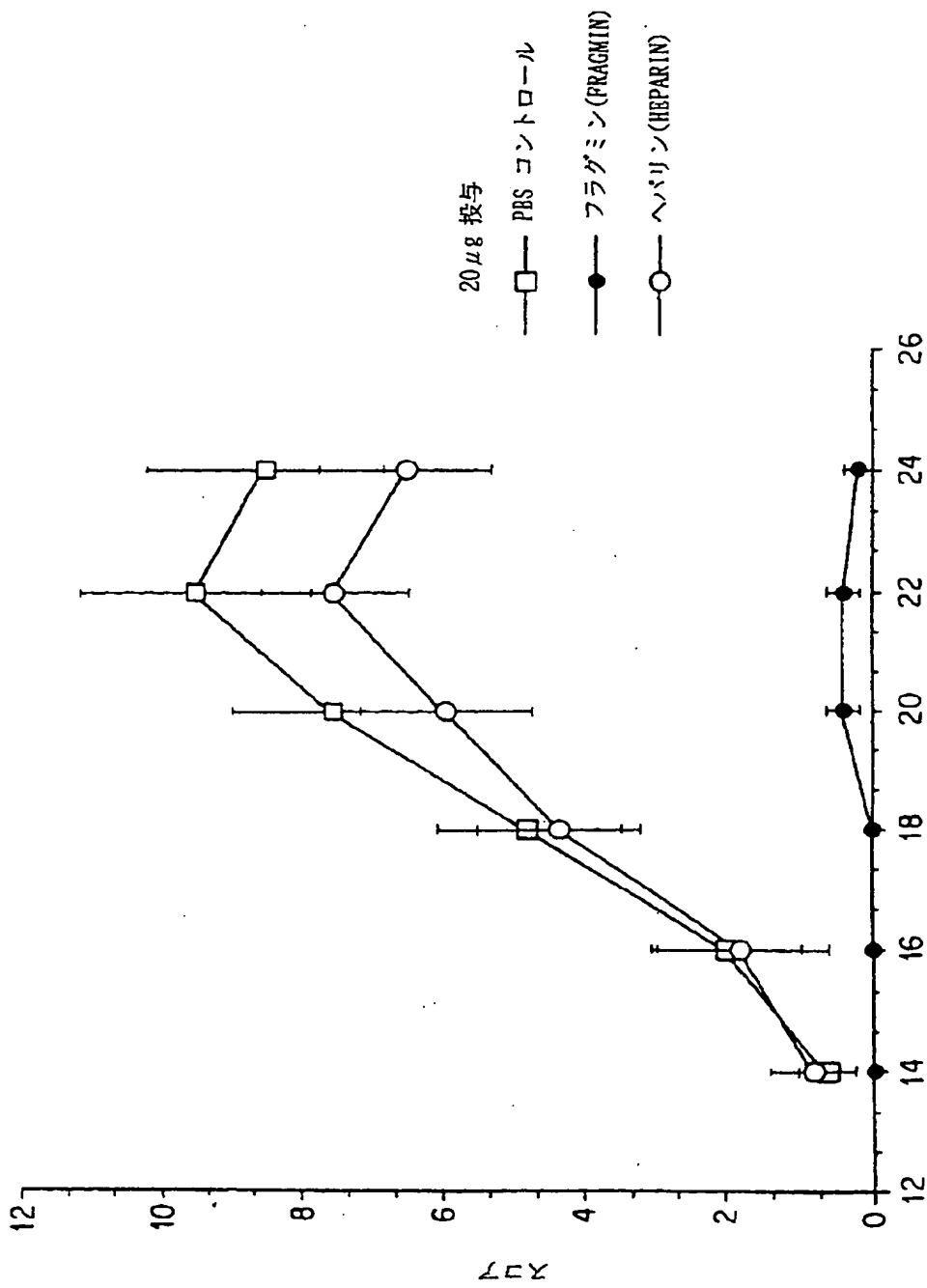


FIG. 3

【図4】

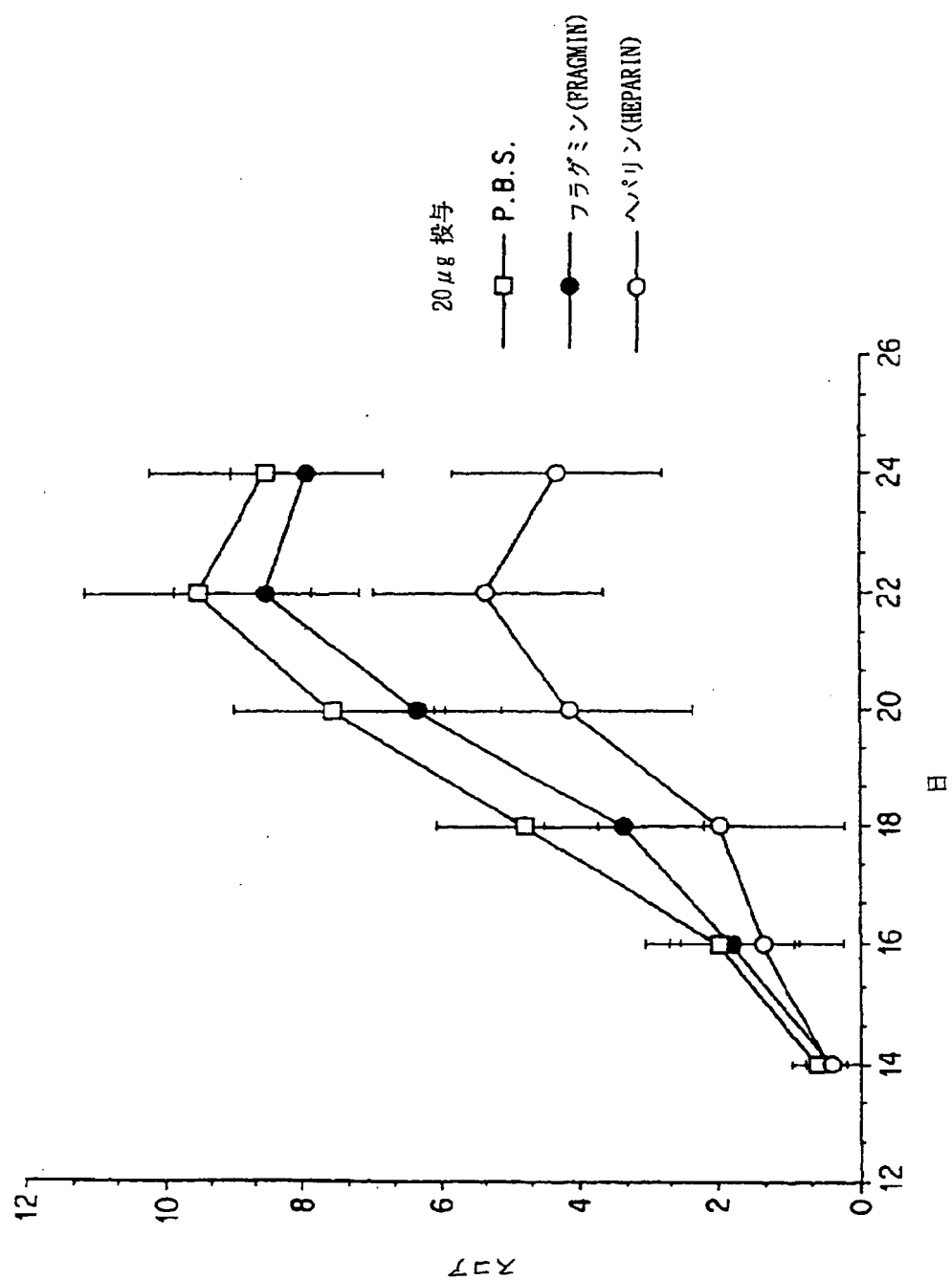


FIG. 4



【図5】

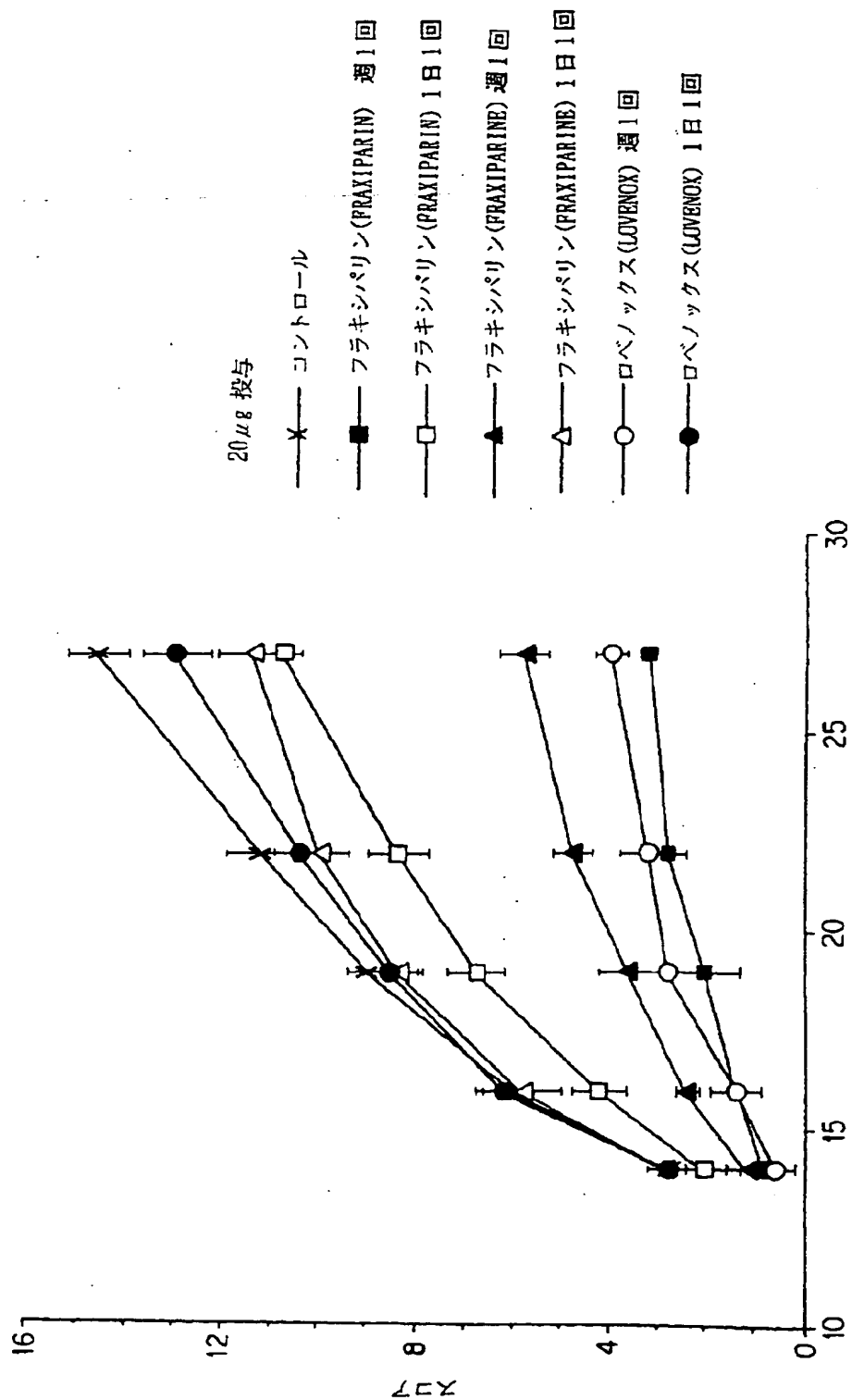


FIG. 5

【図6】

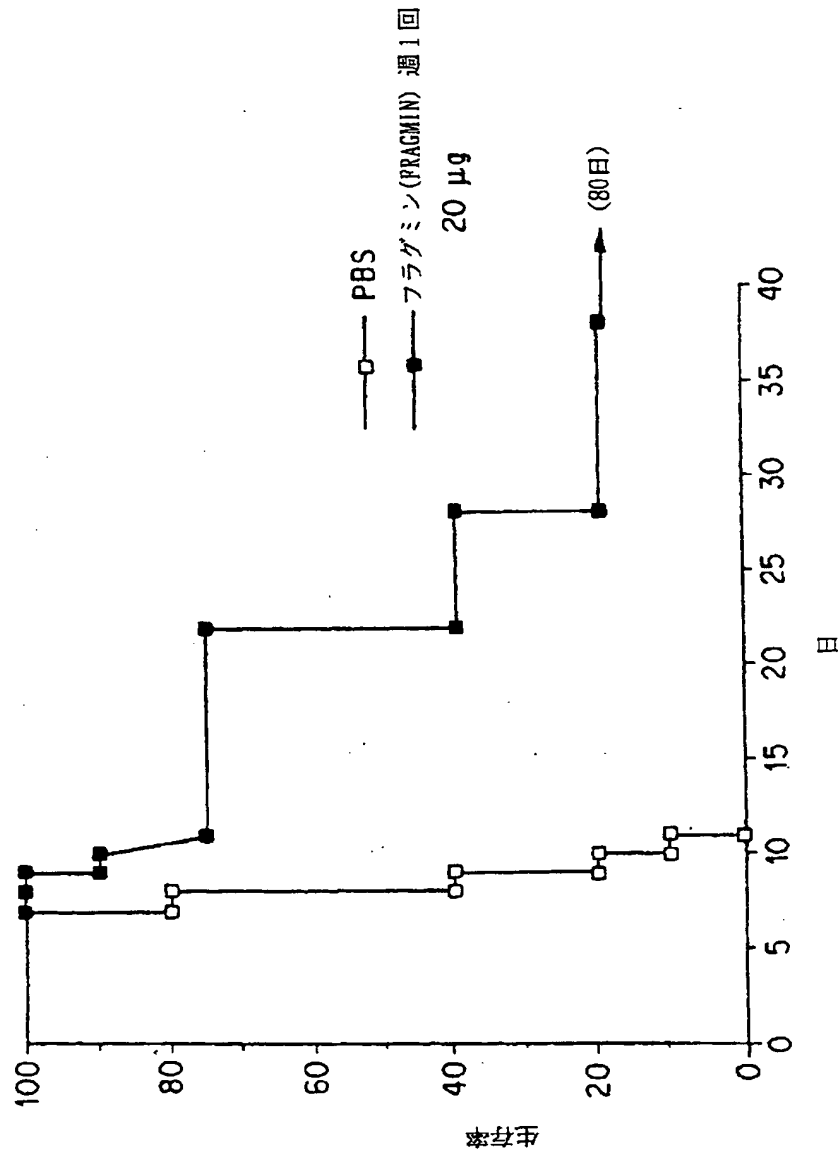


FIG. 6

【図7】

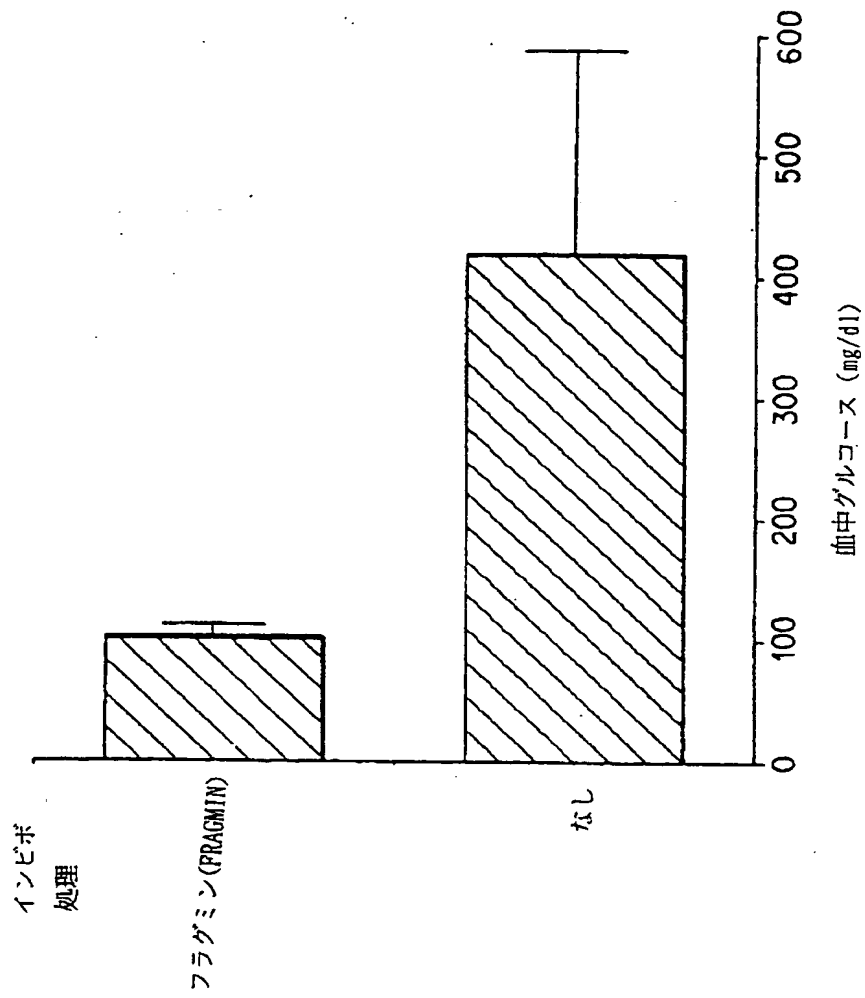


FIG. 7

【図8】

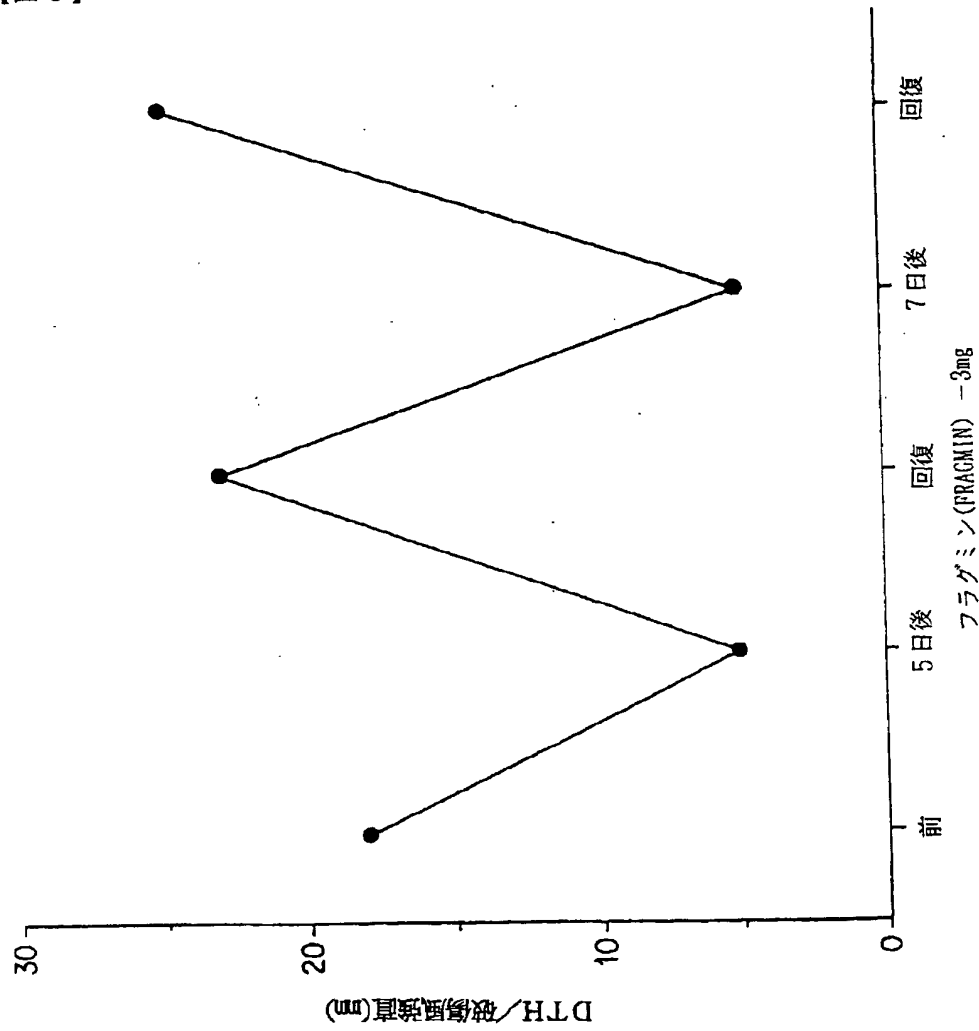


FIG. 8

【図9】

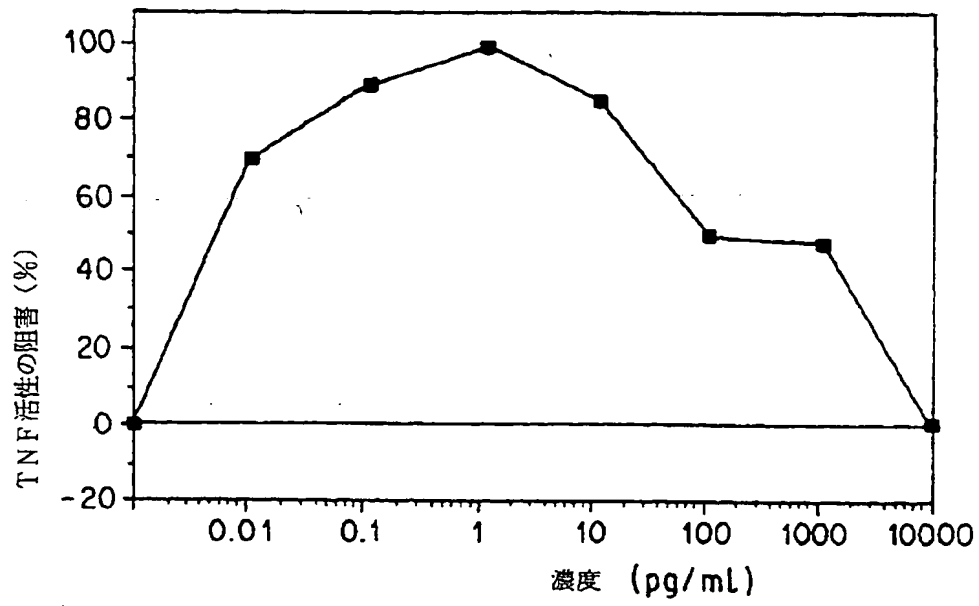


FIG. 9

【図10】

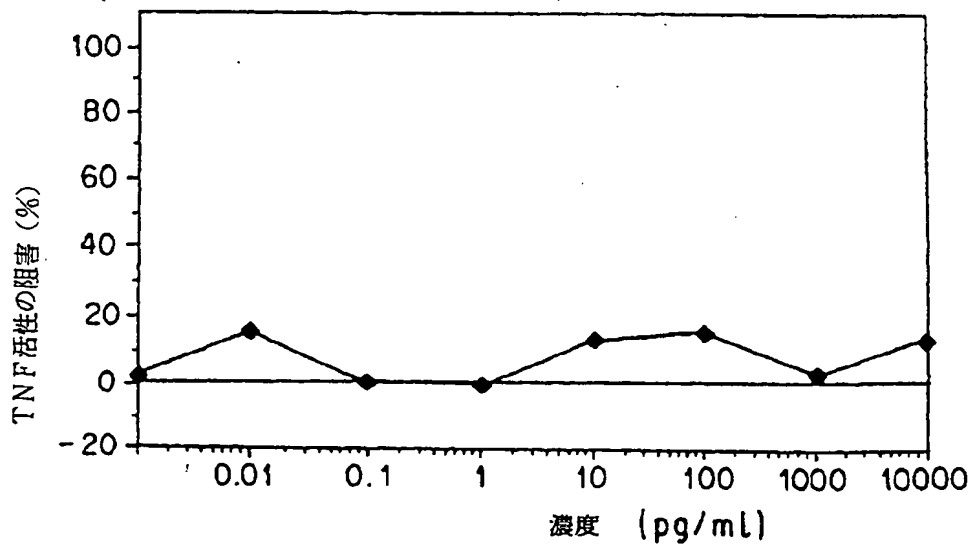


FIG. 10

【図 11】

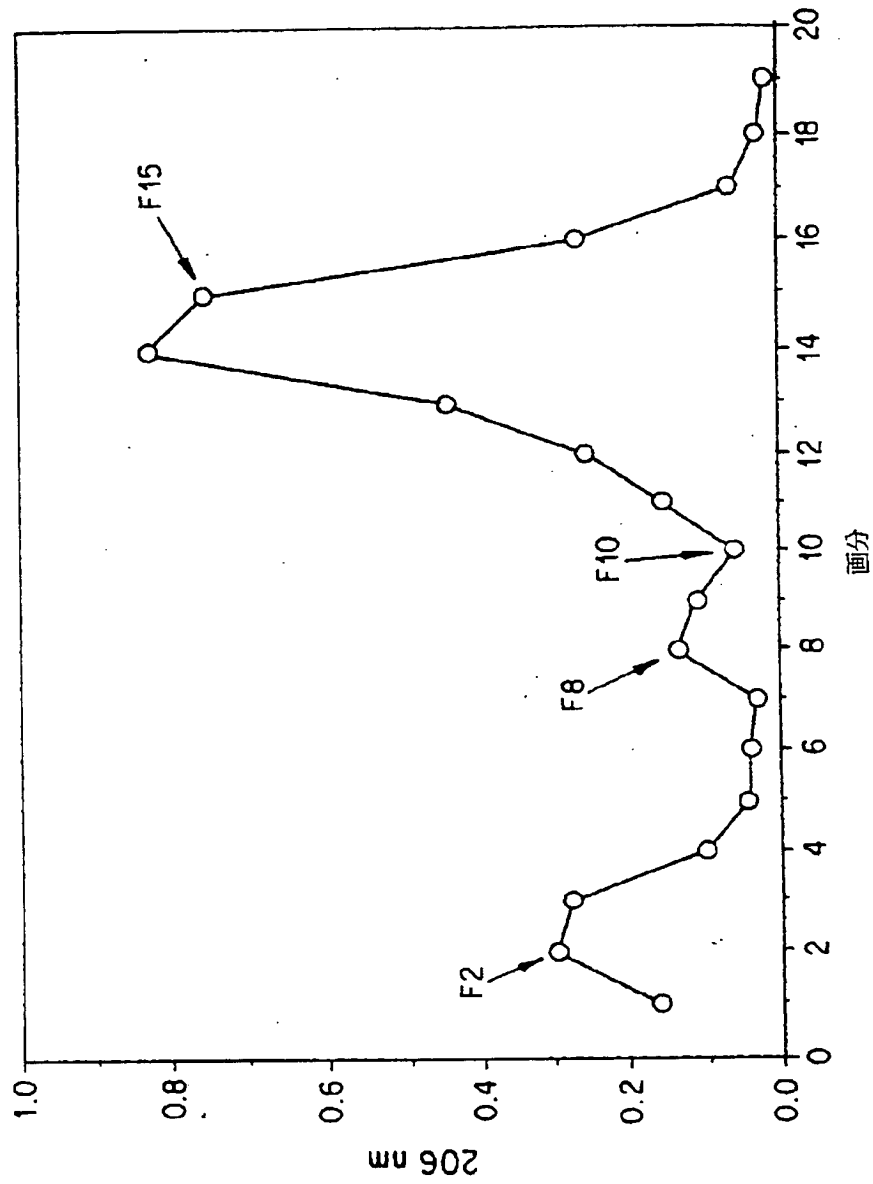


FIG. 11

【図 1 2】

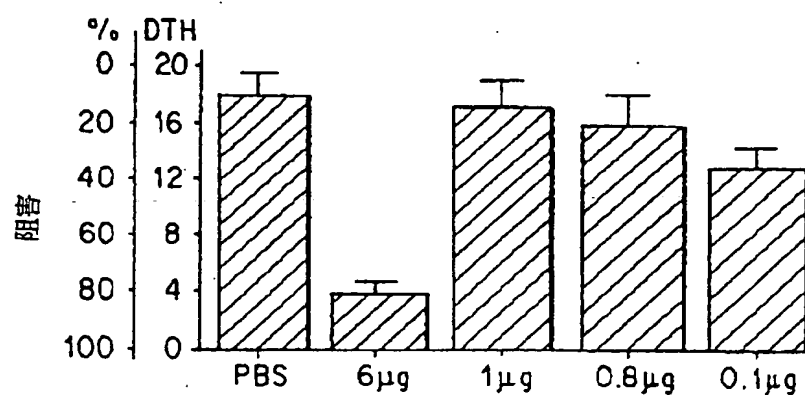


FIG. 12

【図 1 2 A】

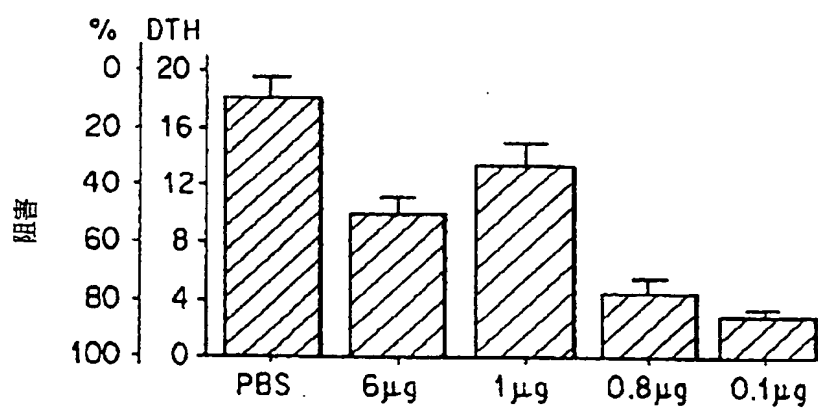


FIG. 12A

【図 12 B】

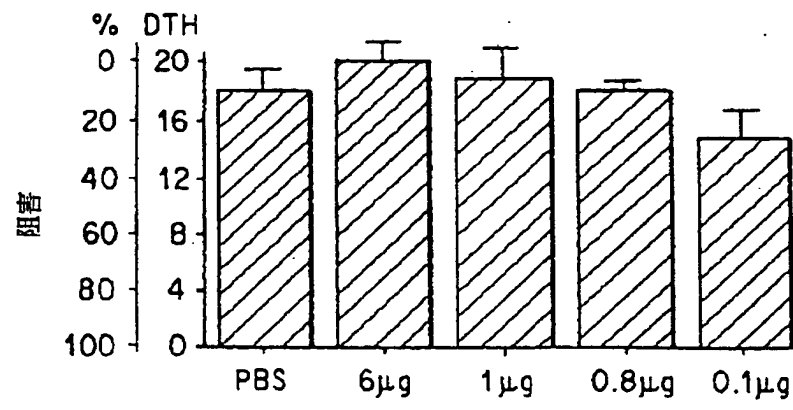


FIG. 12B



【図 13】

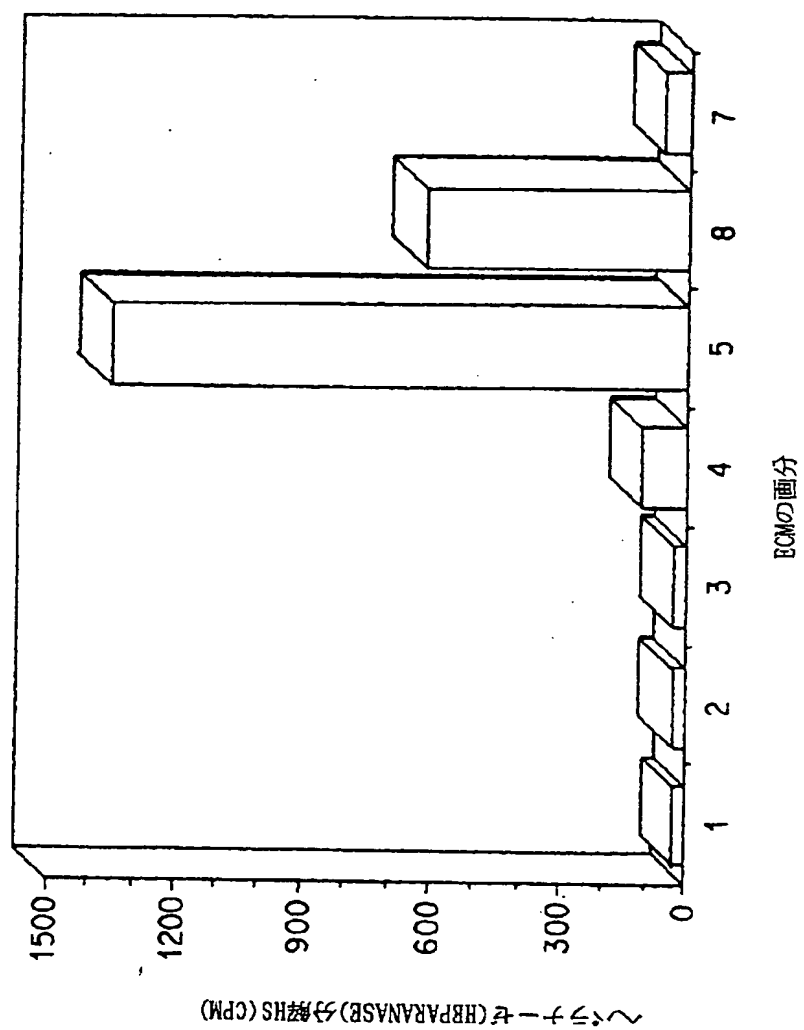


FIG. 13

【図14】

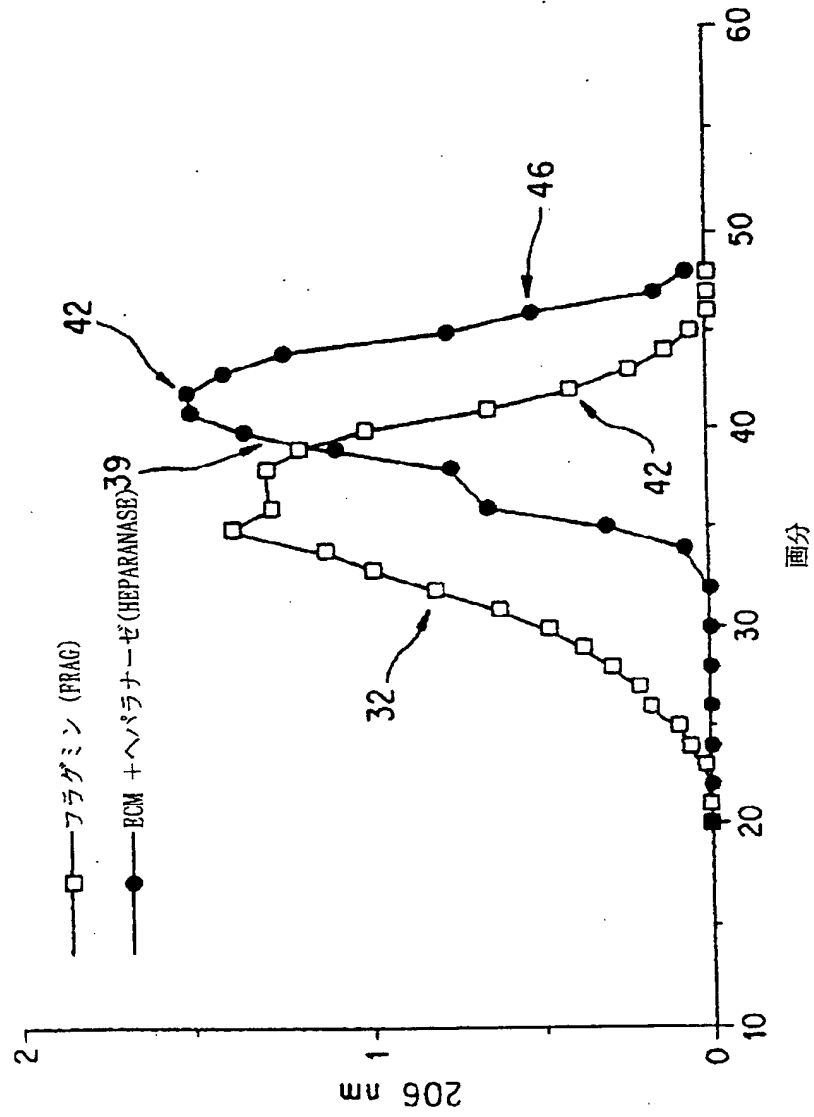


FIG. 14

【図 15】

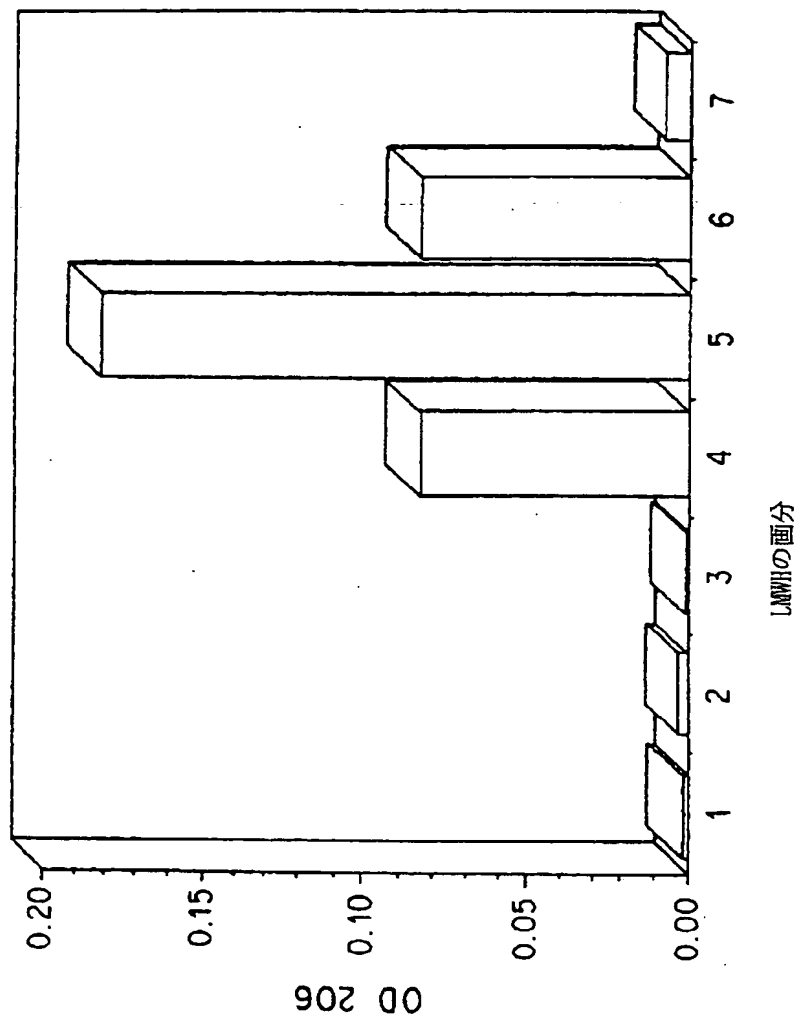


FIG. 15

【図16】

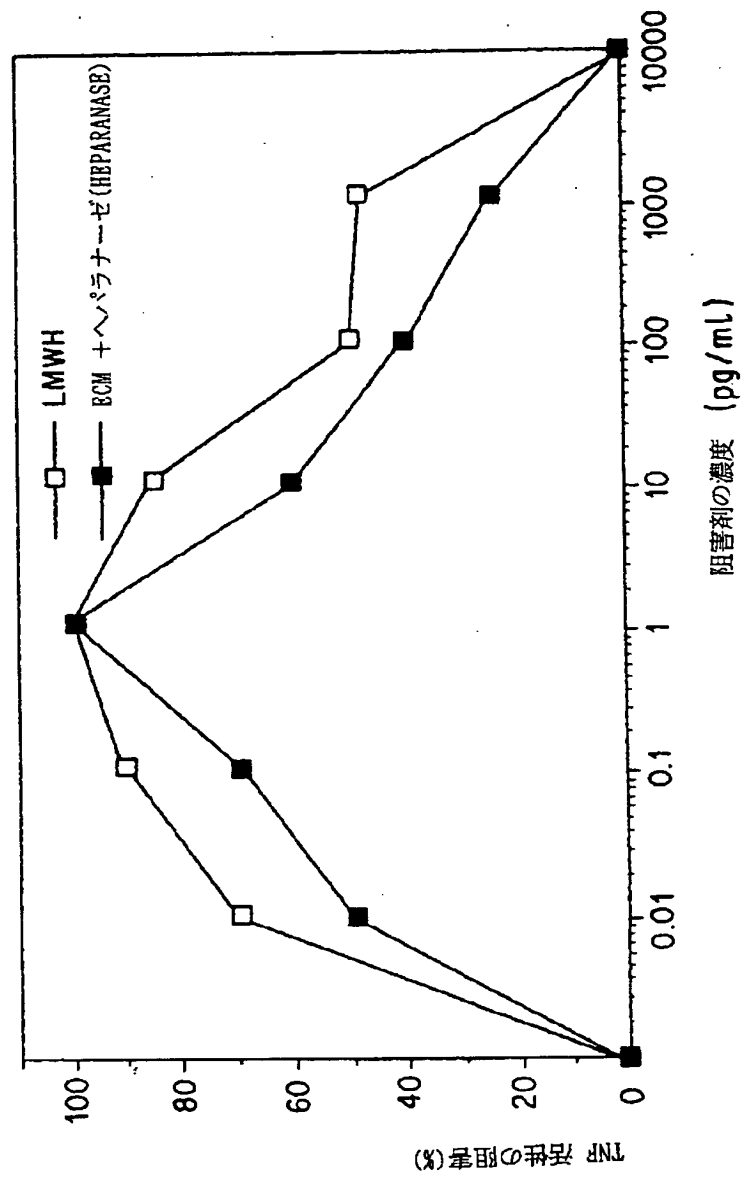


FIG. 16

【図17】

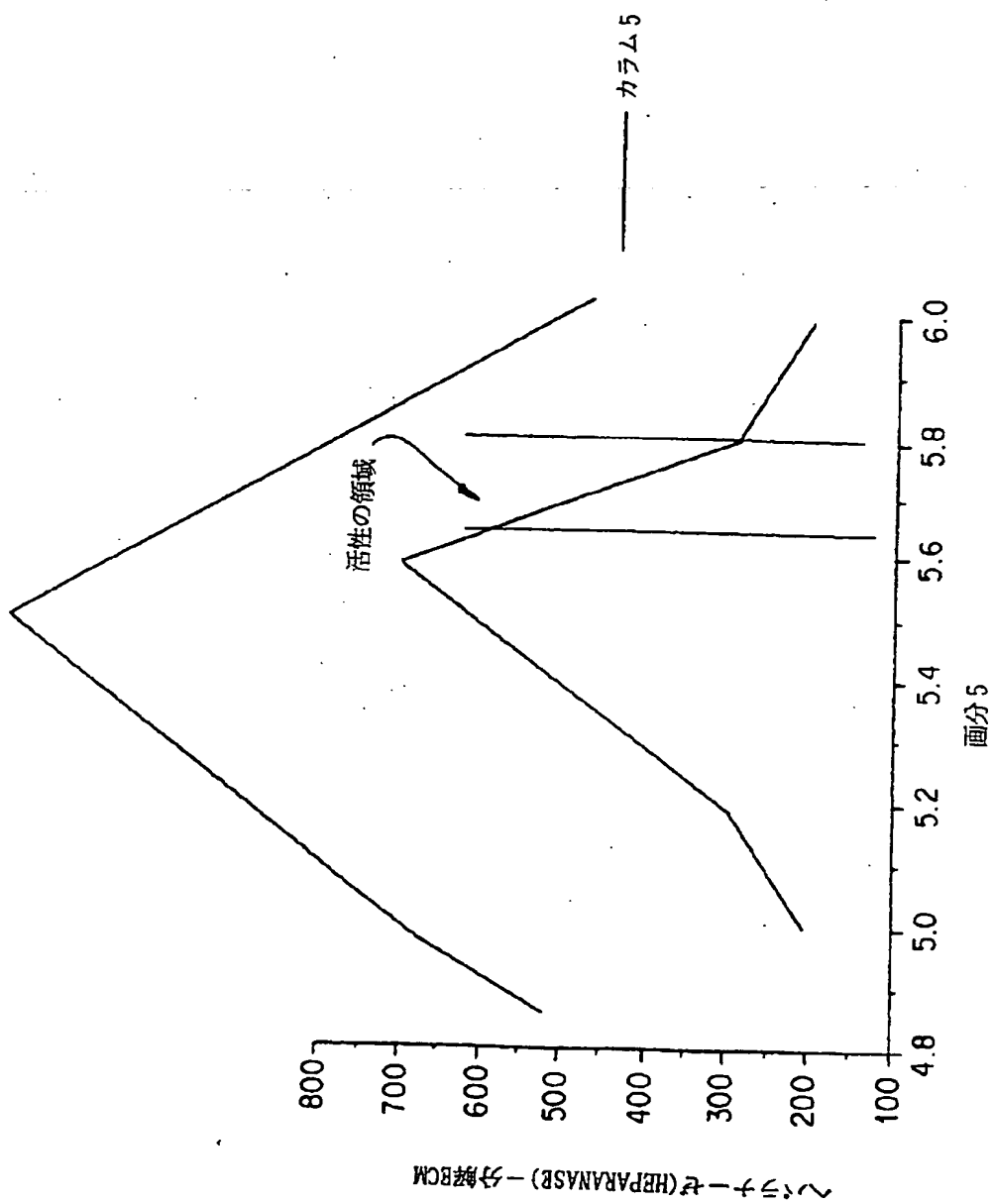


FIG. 17

【図 18 A】

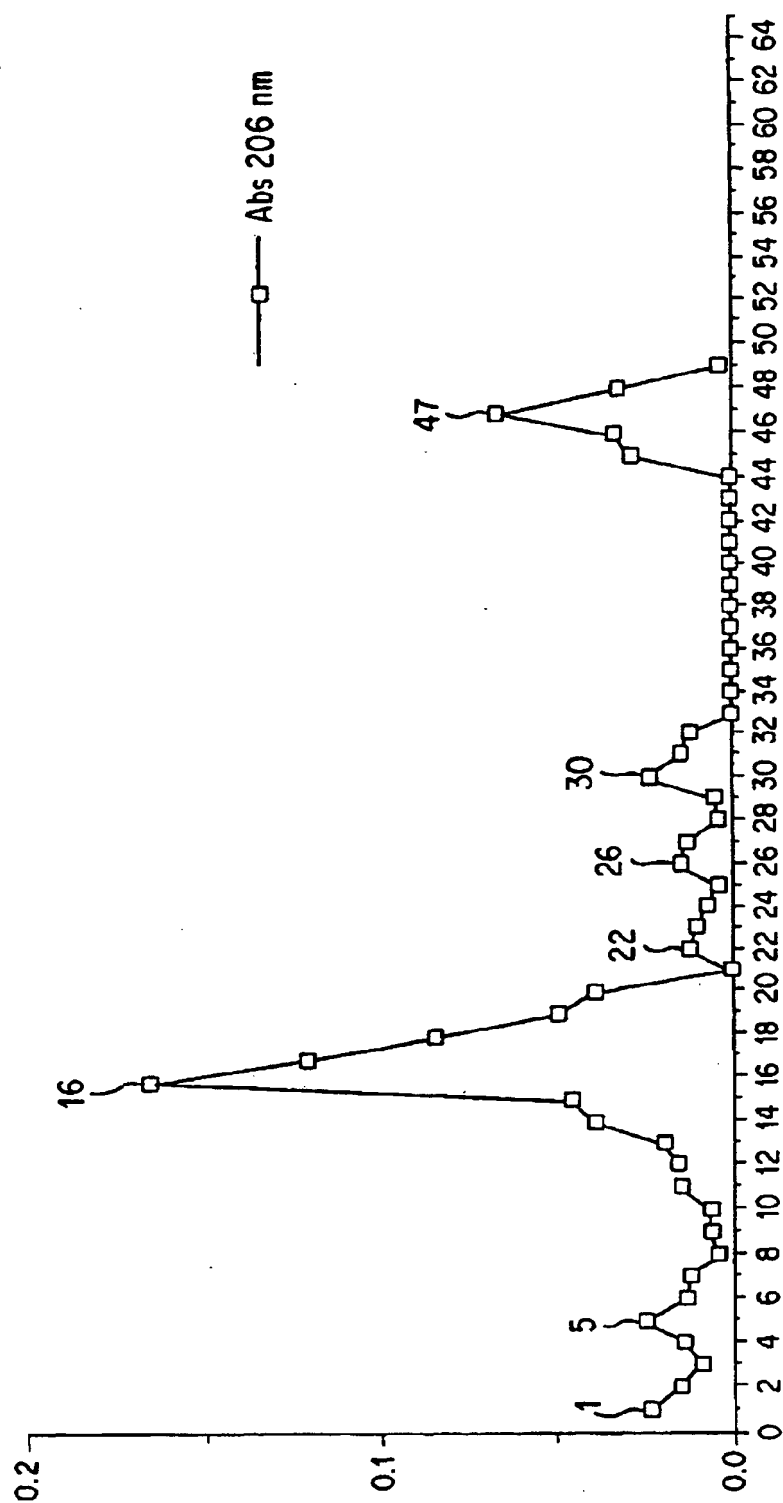


FIG. 18A

【图 18B】

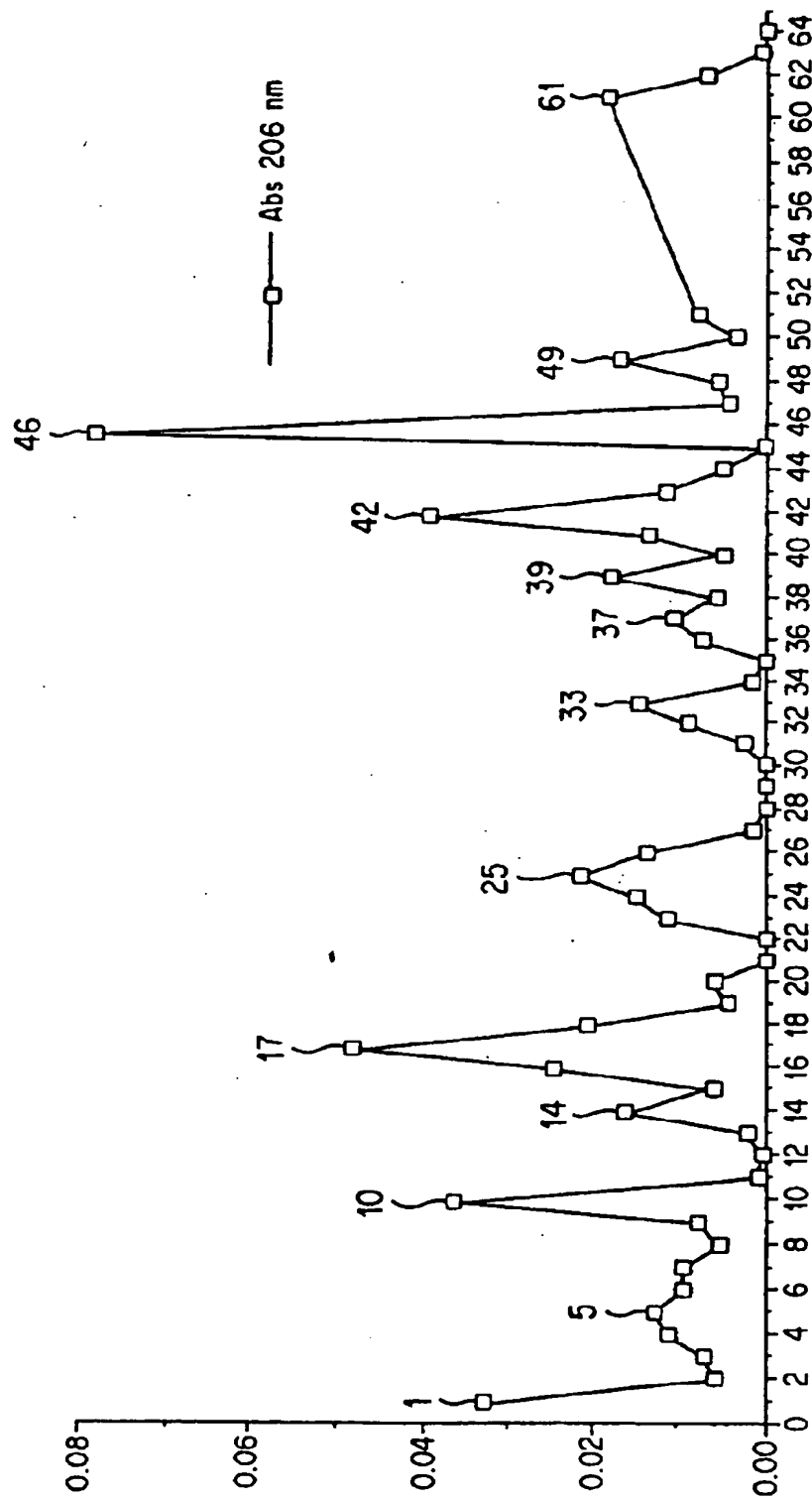


FIG. 18B

【図19】

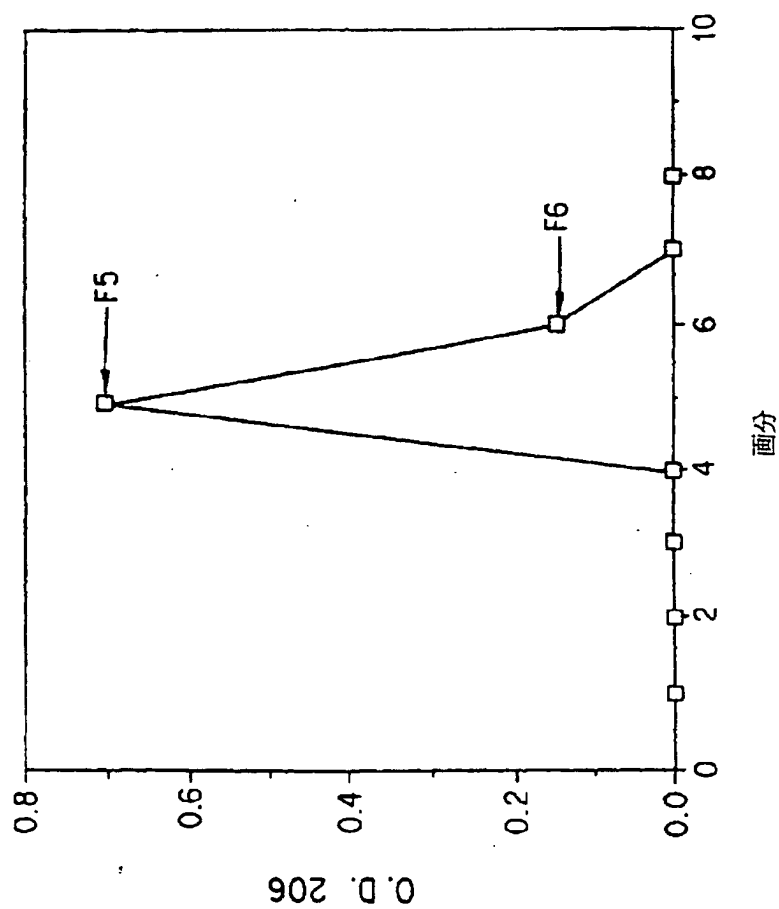


FIG. 19



【図 20 A】

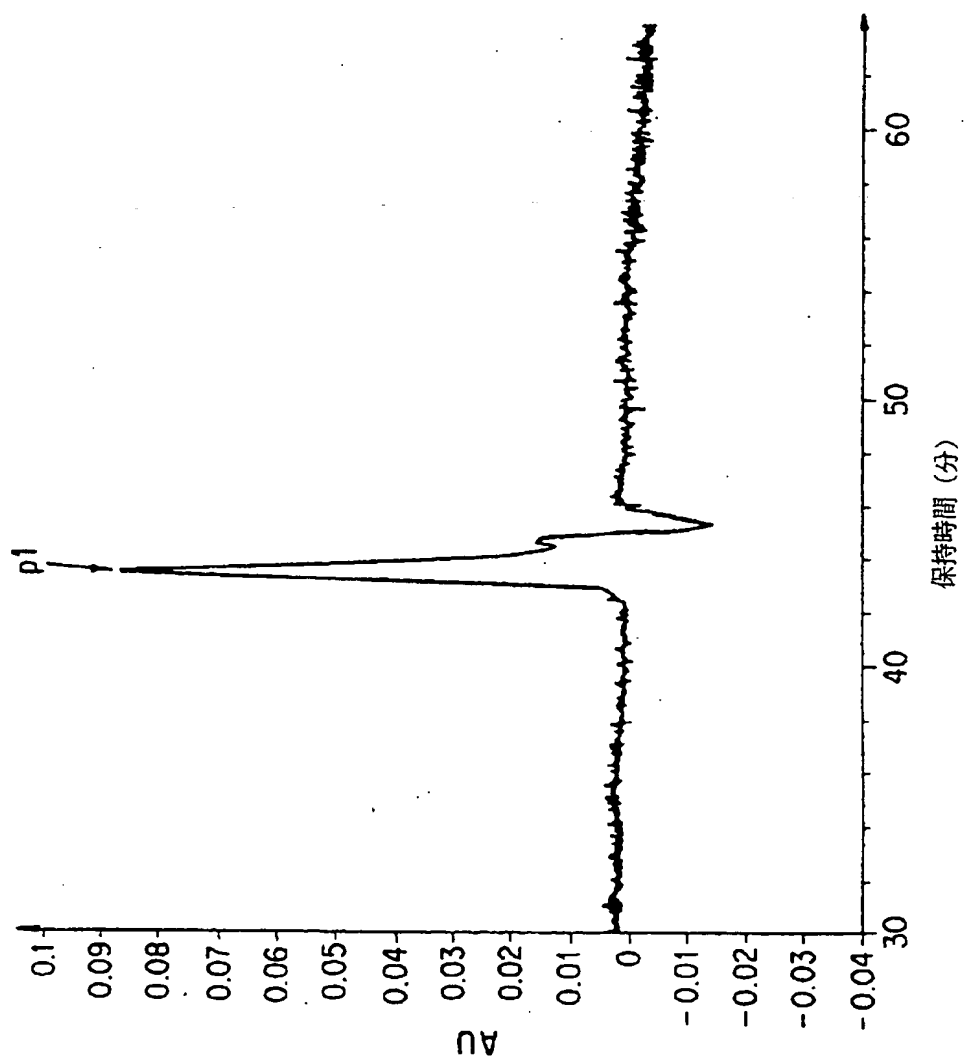


FIG. 20A

【図20B】

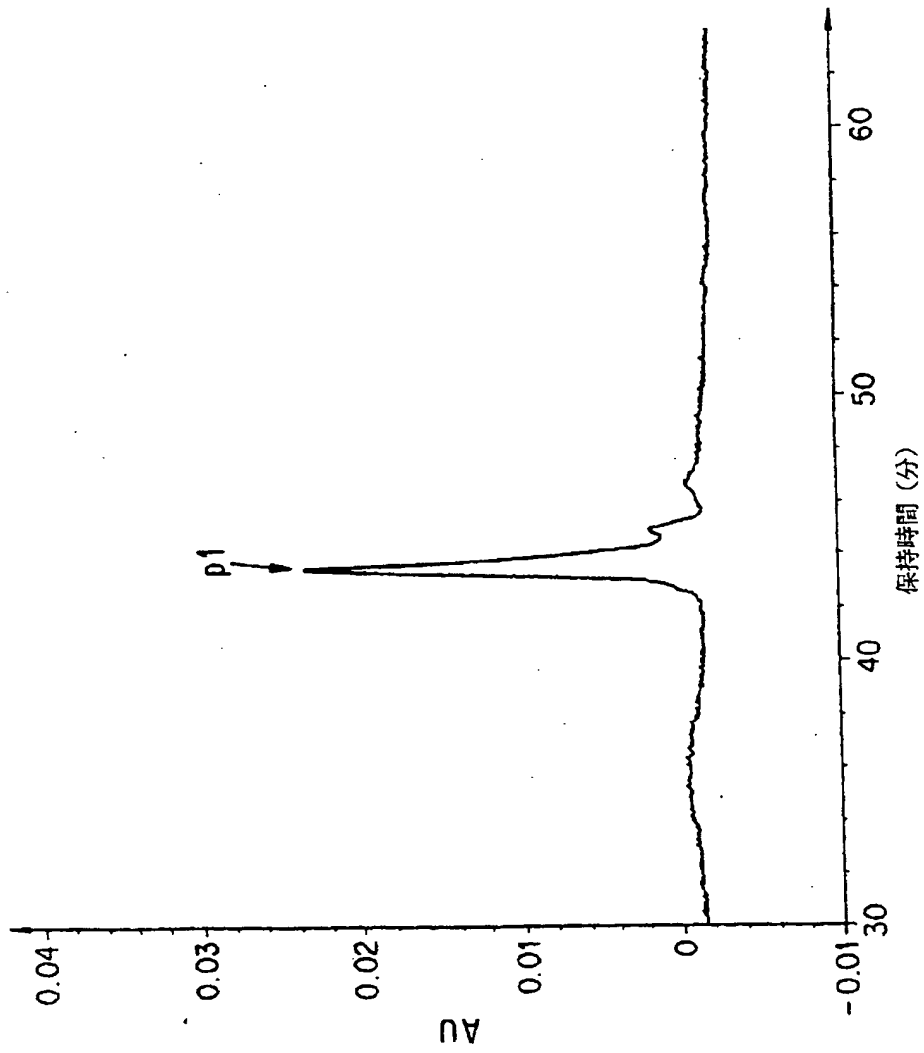
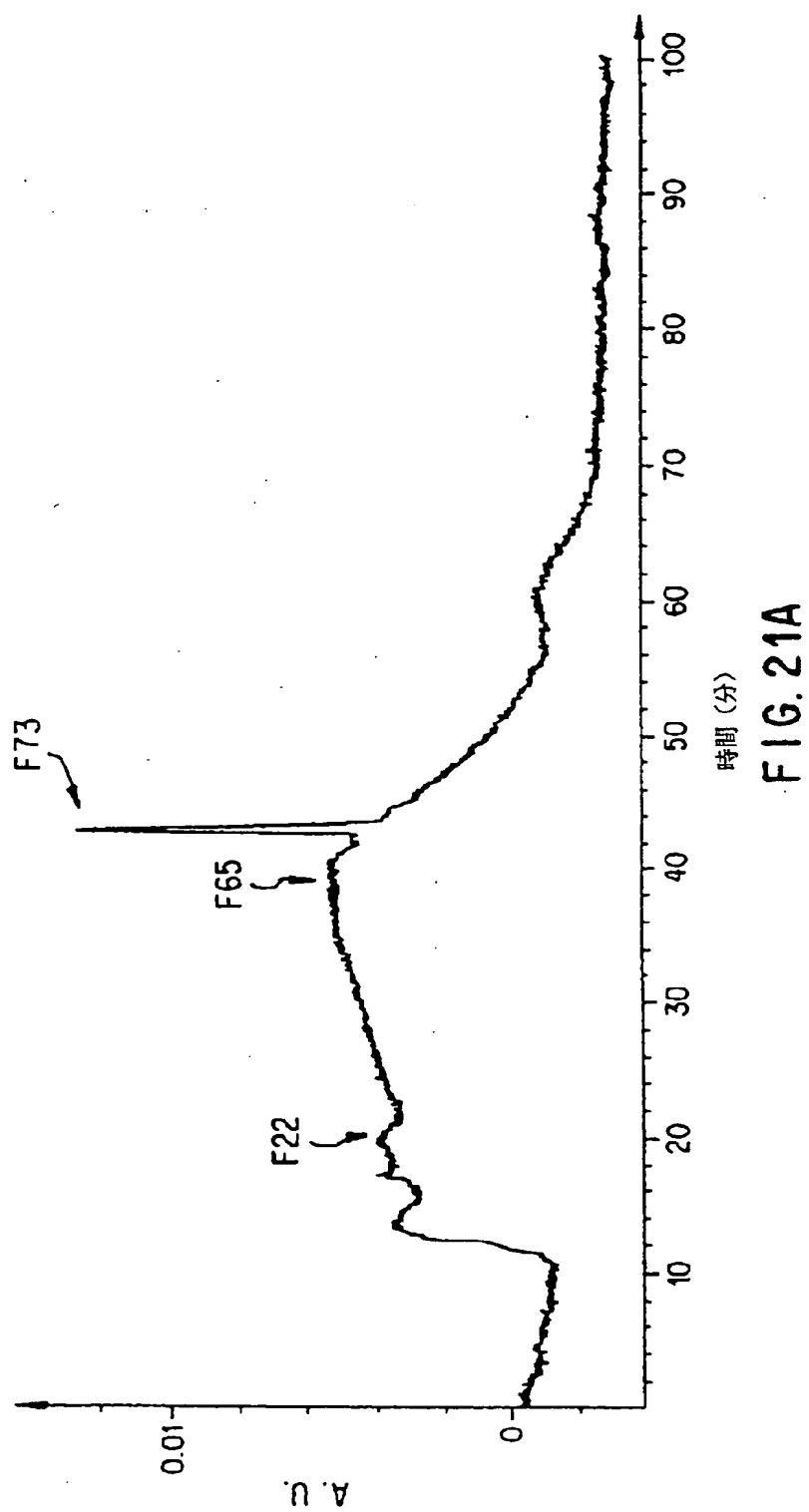


FIG. 20B

【図 2 1 A】



【図 2 1 B】

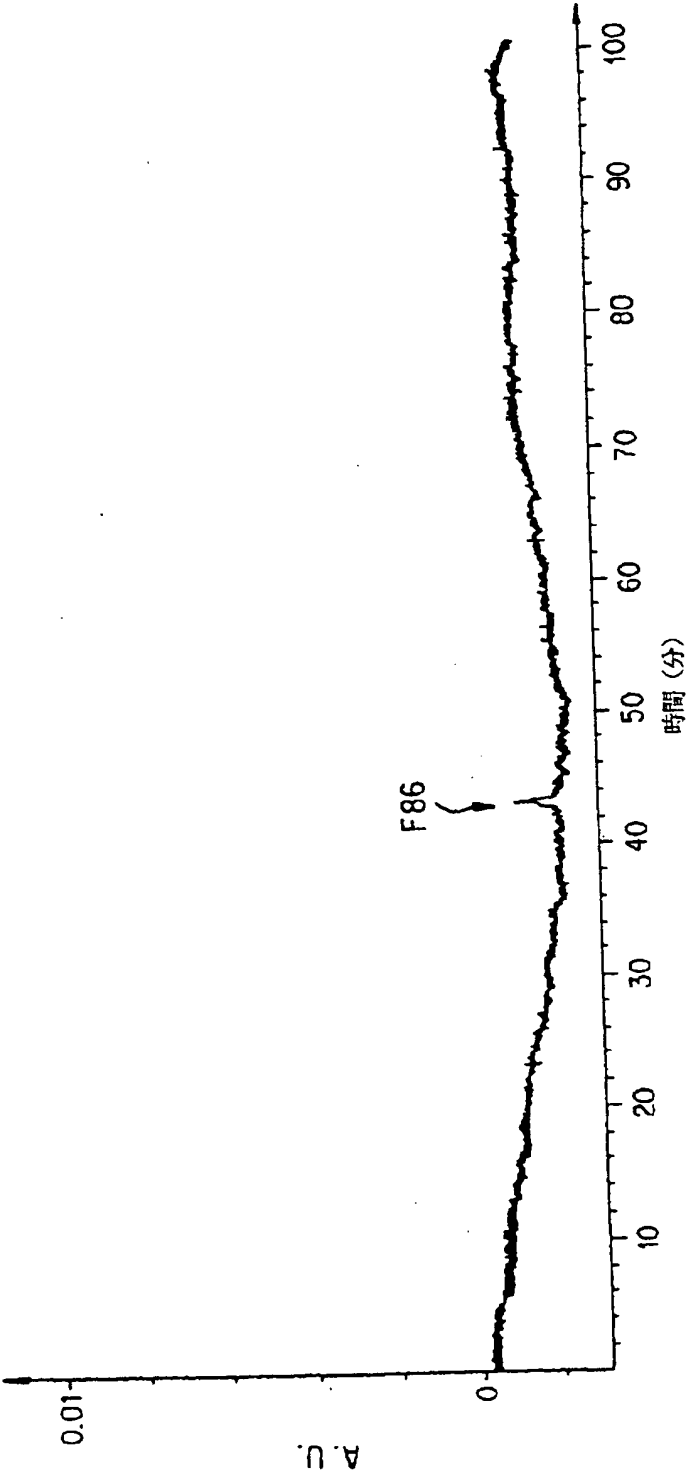


FIG. 21B

【图 2 2】

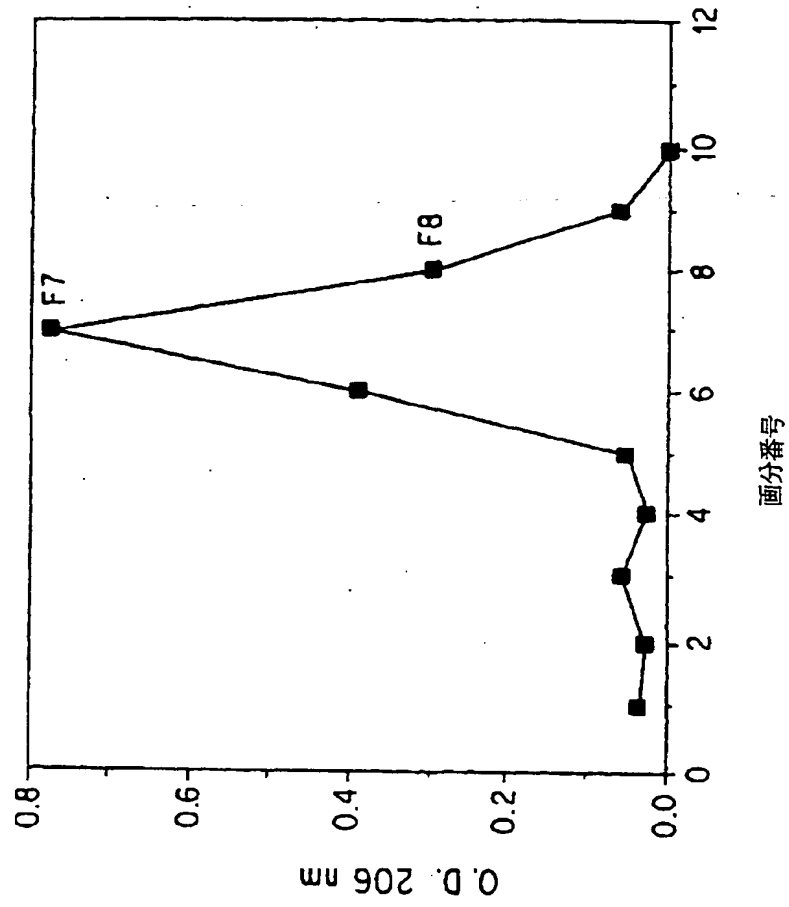


FIG. 22

【図 23】

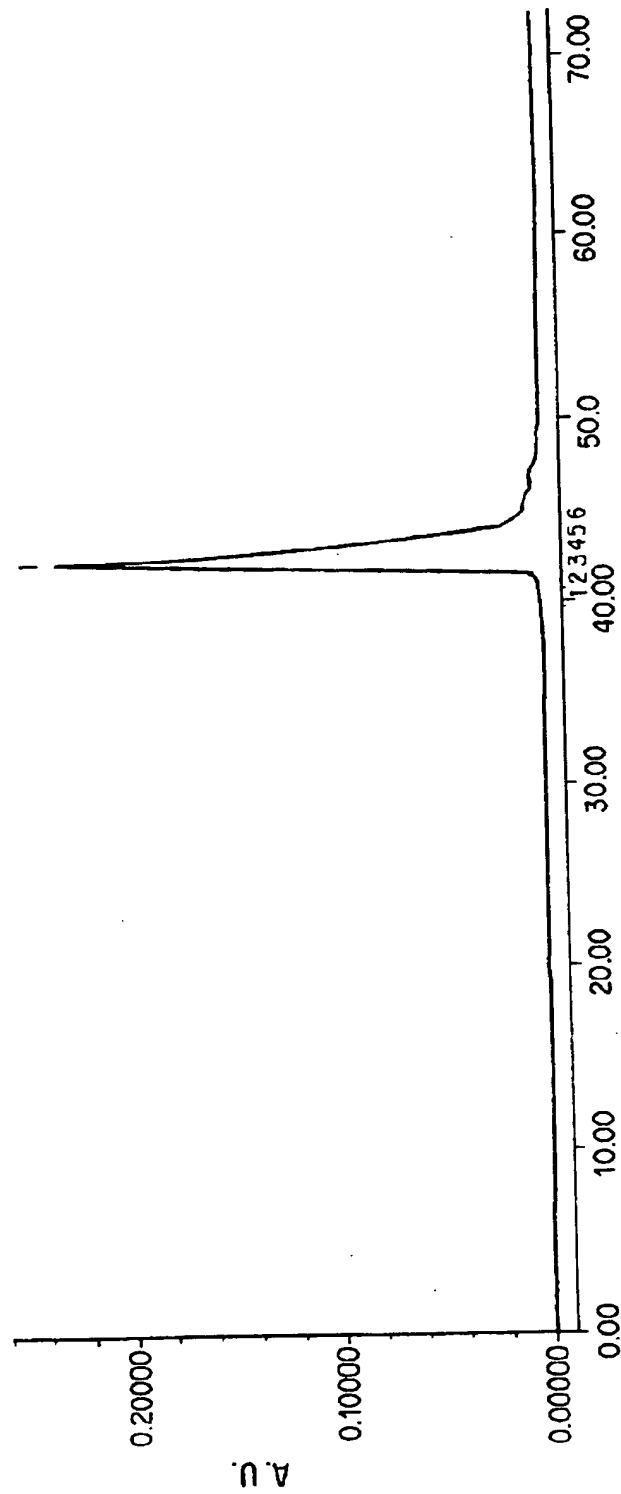


FIG. 23

【图 2 4】

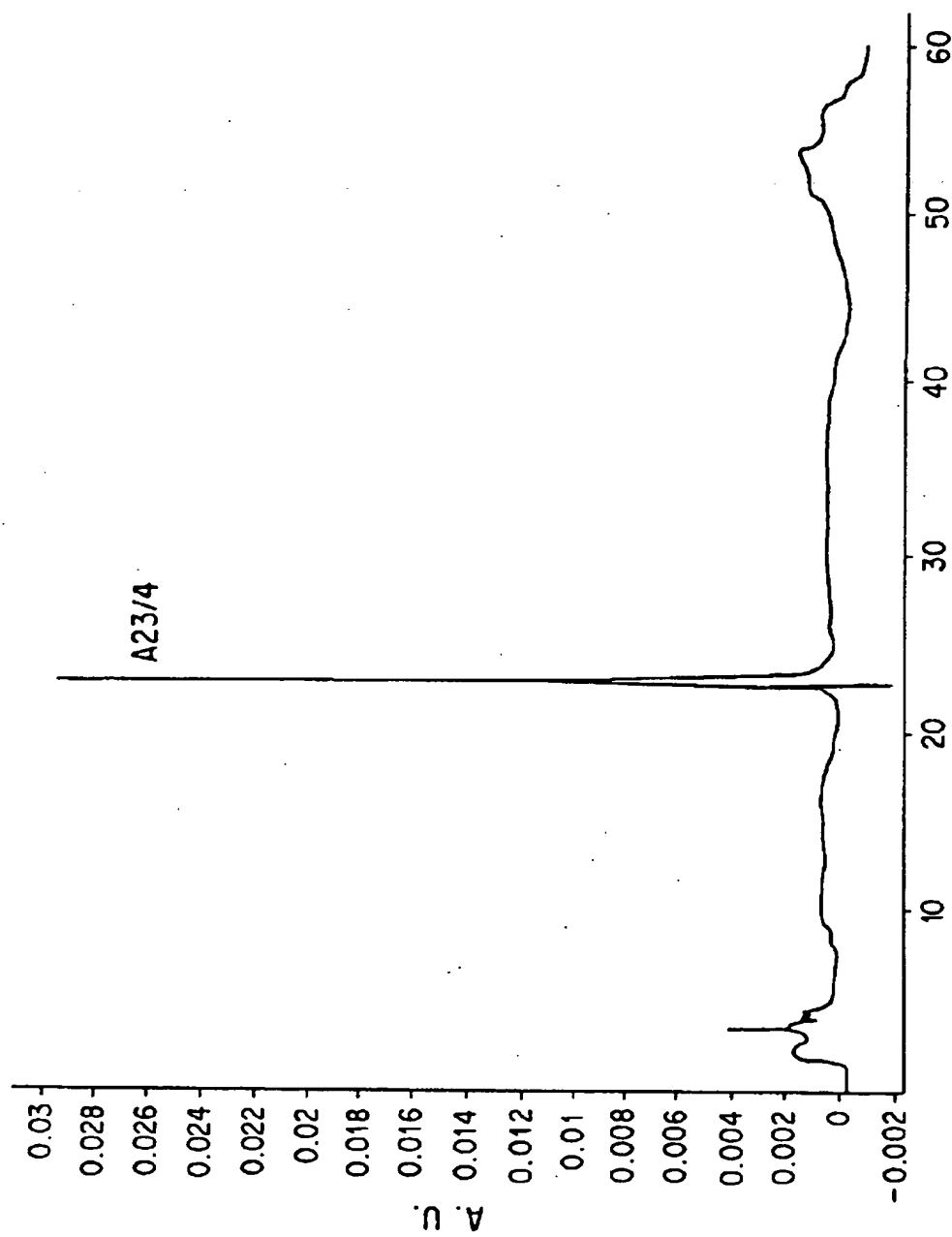


FIG. 24

【図 2 5 A】

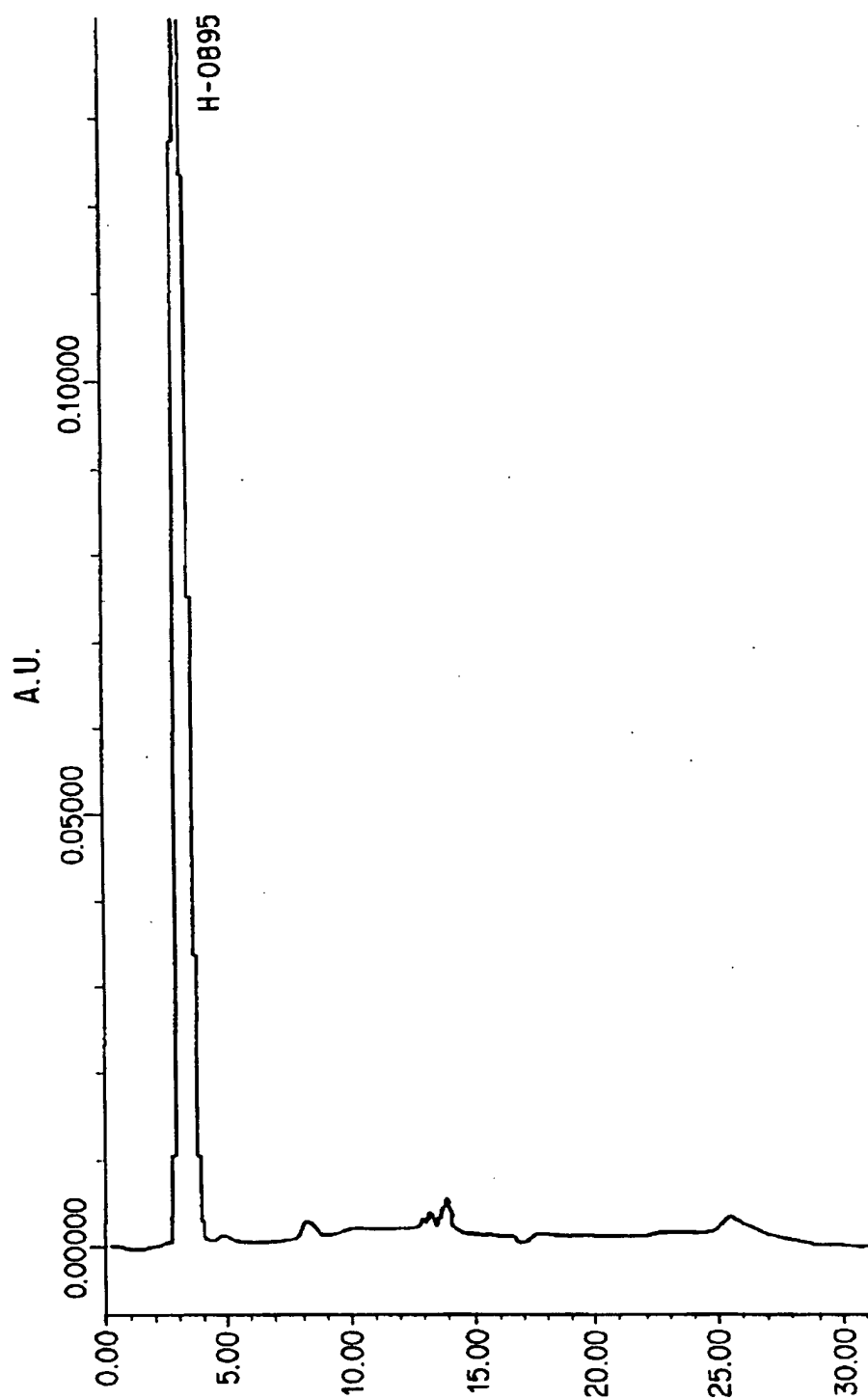


FIG. 25A



【図 2 5 B】

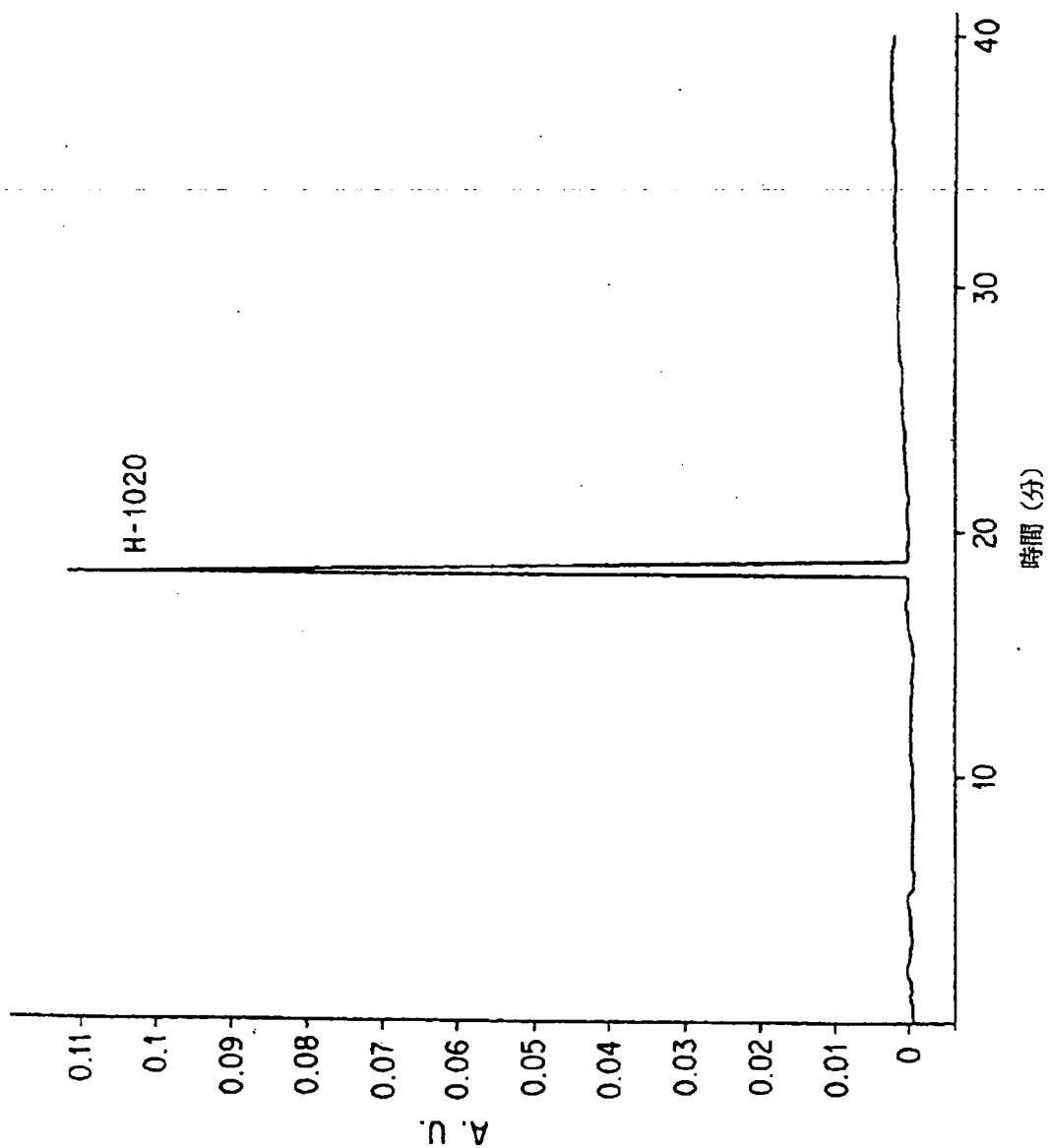


FIG. 25B

【図 25 C】

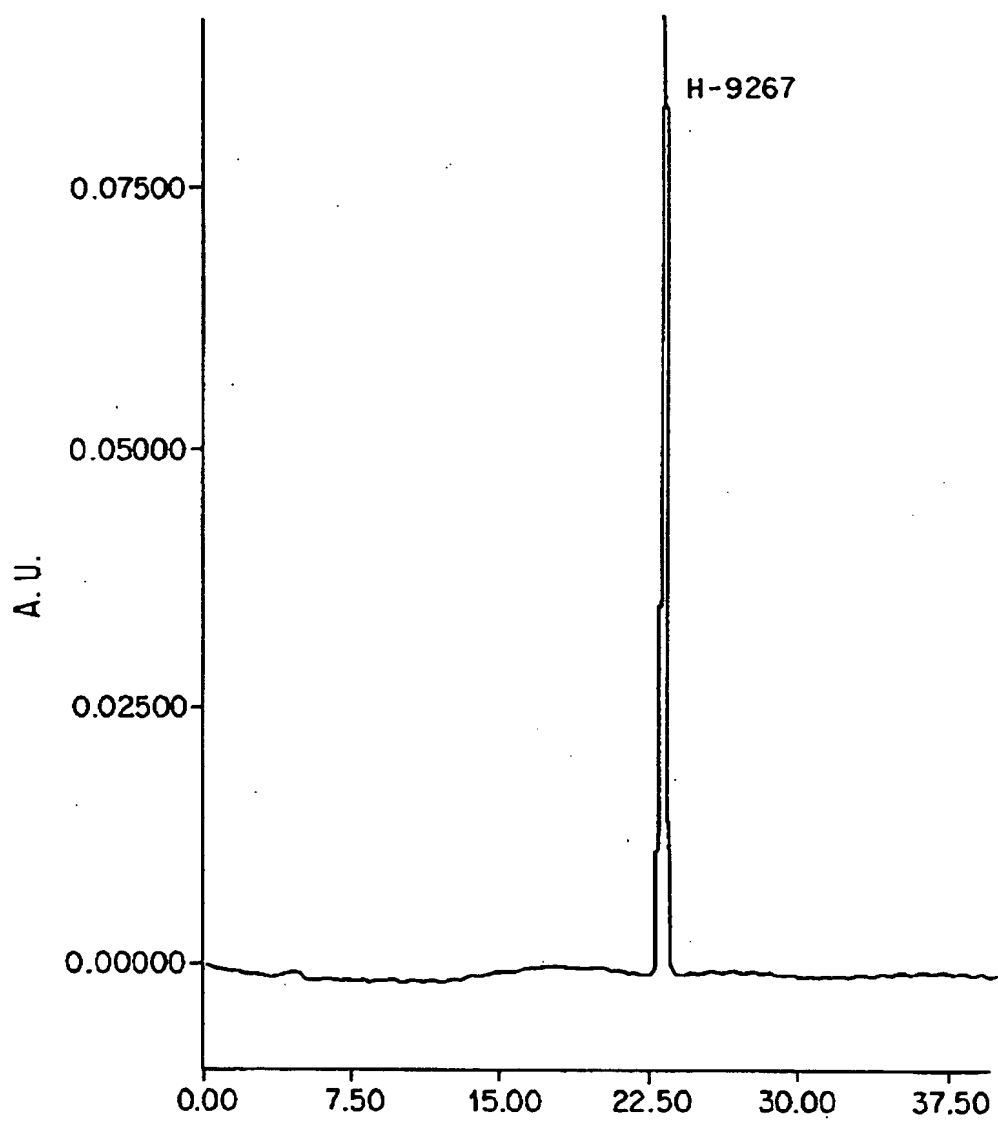


FIG. 25C

【図 26】

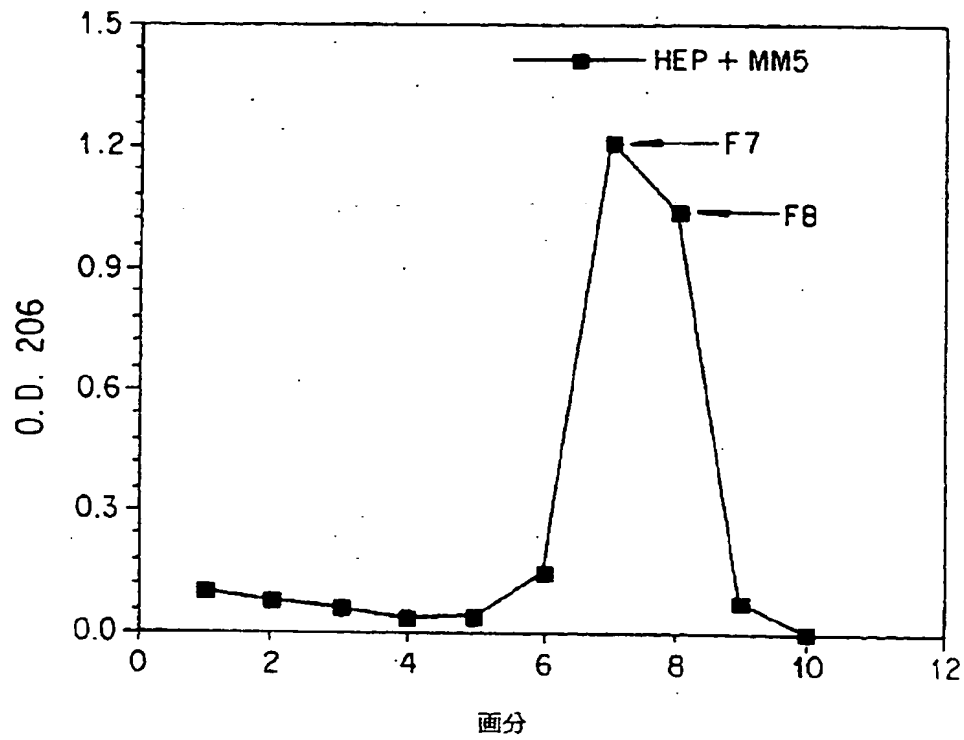


FIG. 26

【图 27】

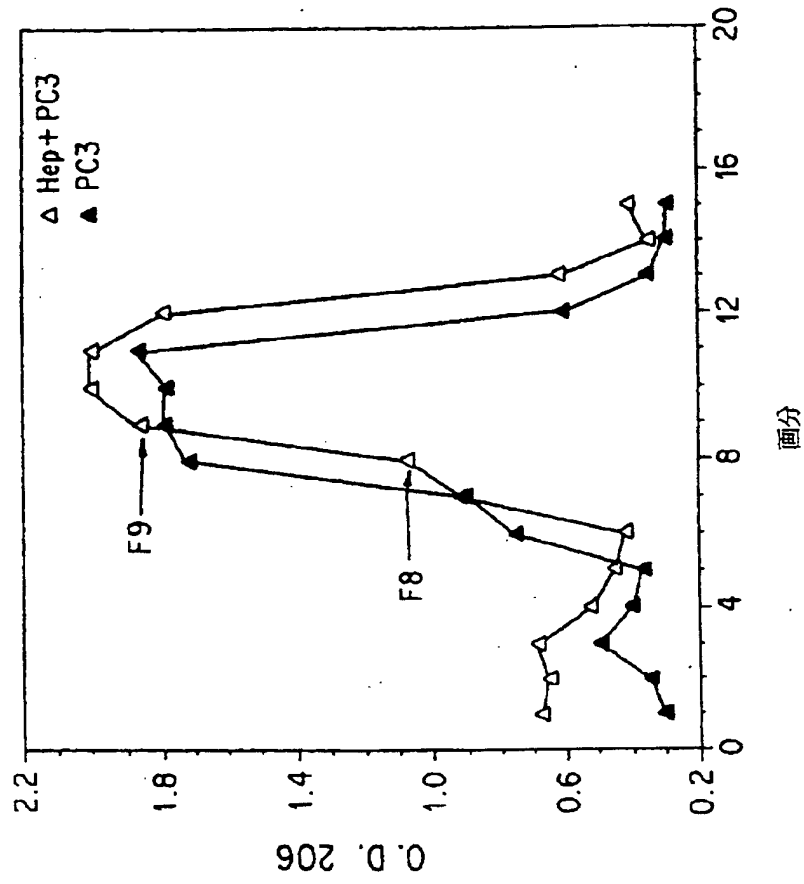


FIG. 27

【図 28 A】

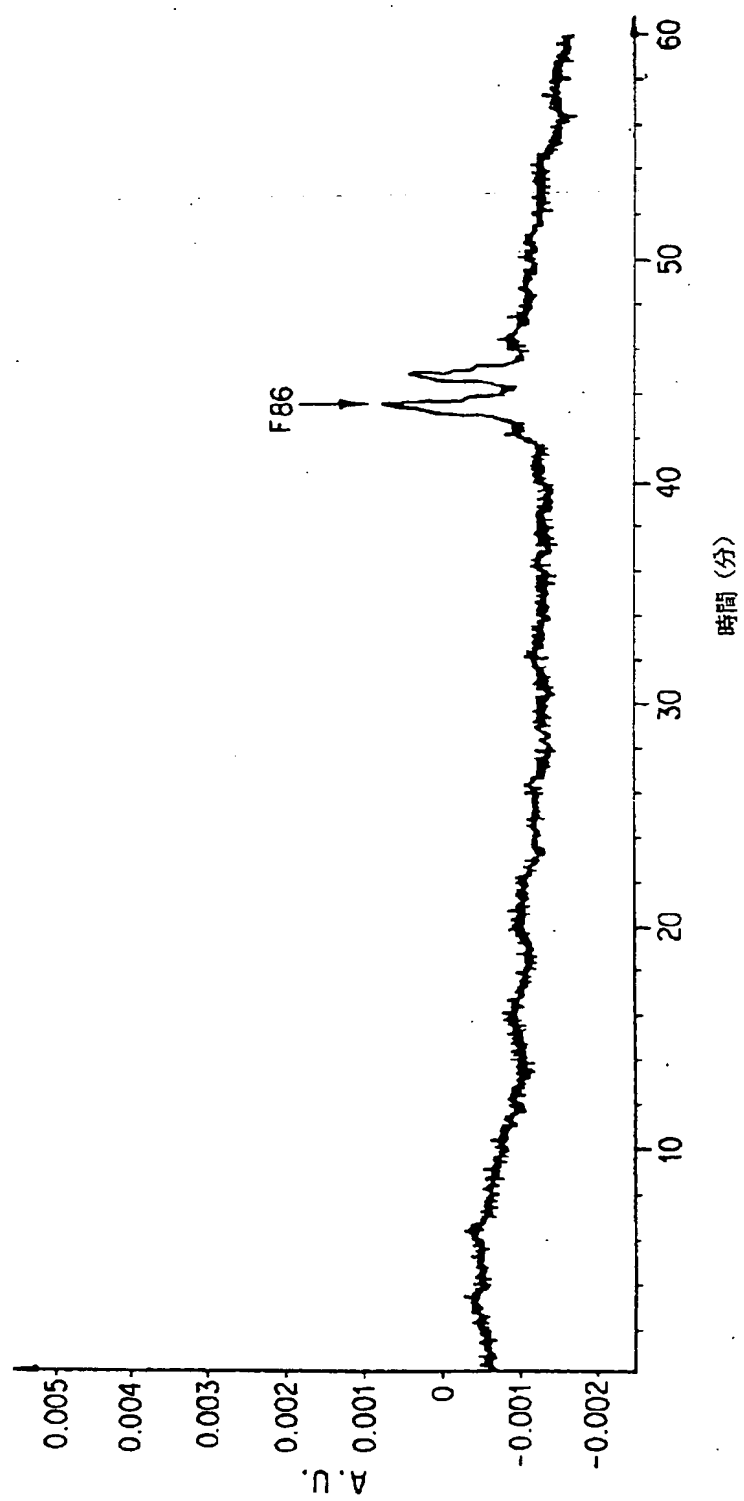


FIG. 28A

【図28B】

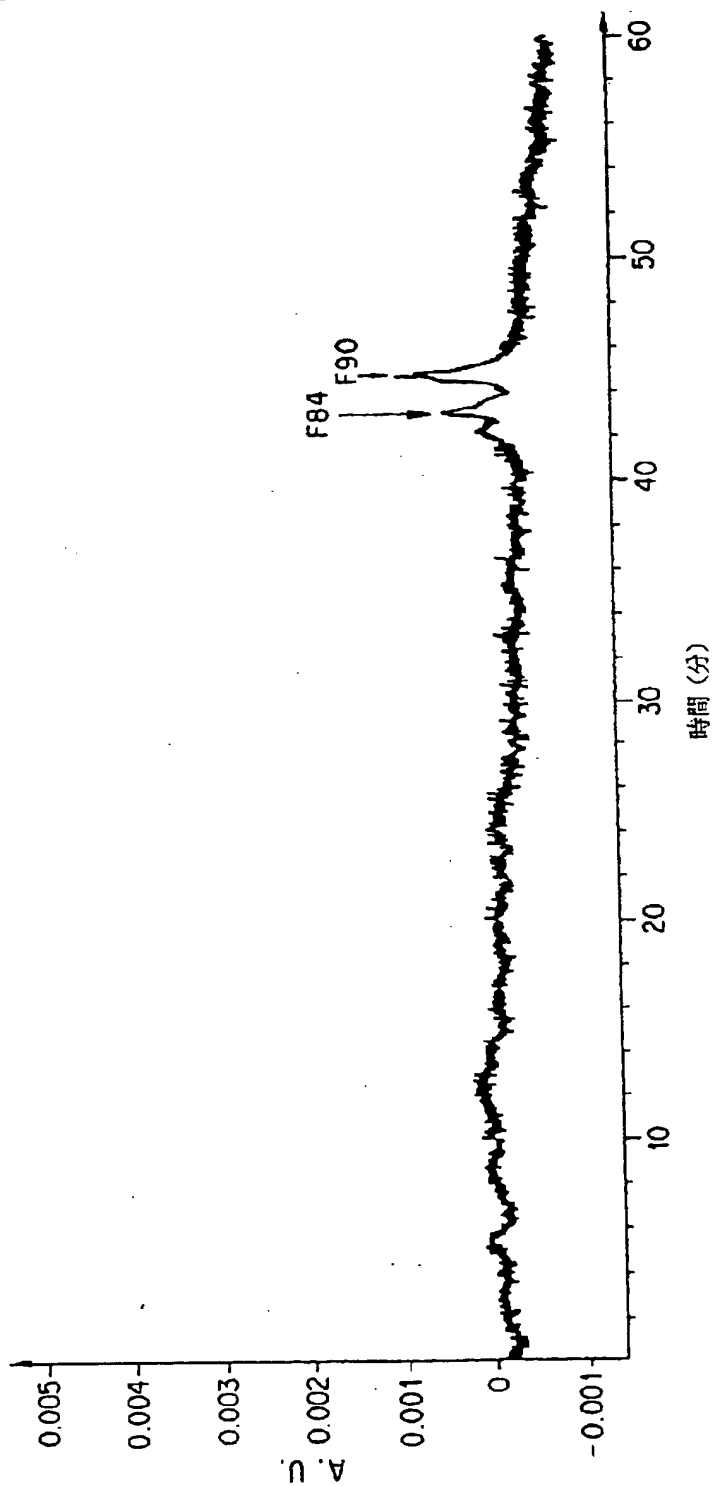
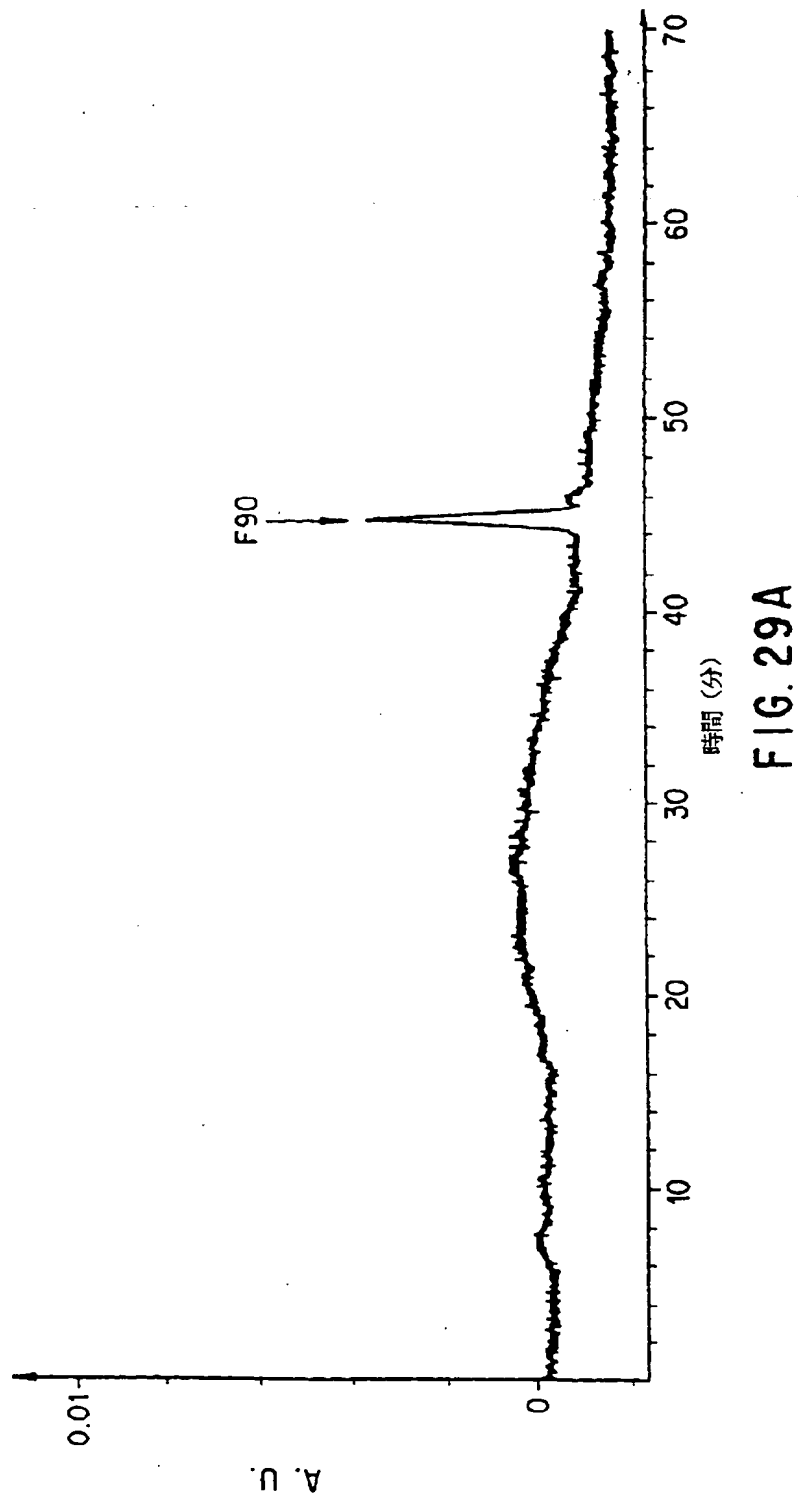


FIG. 28B

【図 2 9 A】



【図29B】

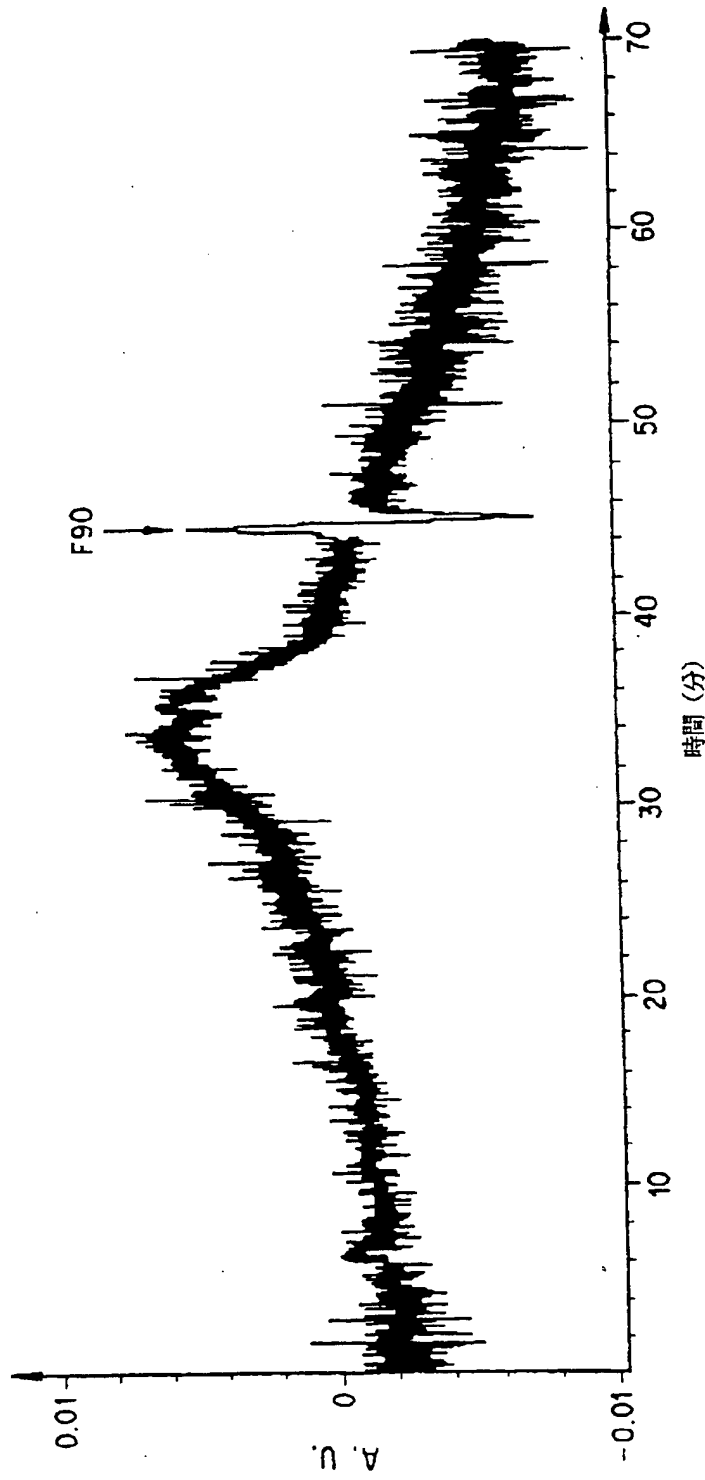


FIG. 29B



【図 30】

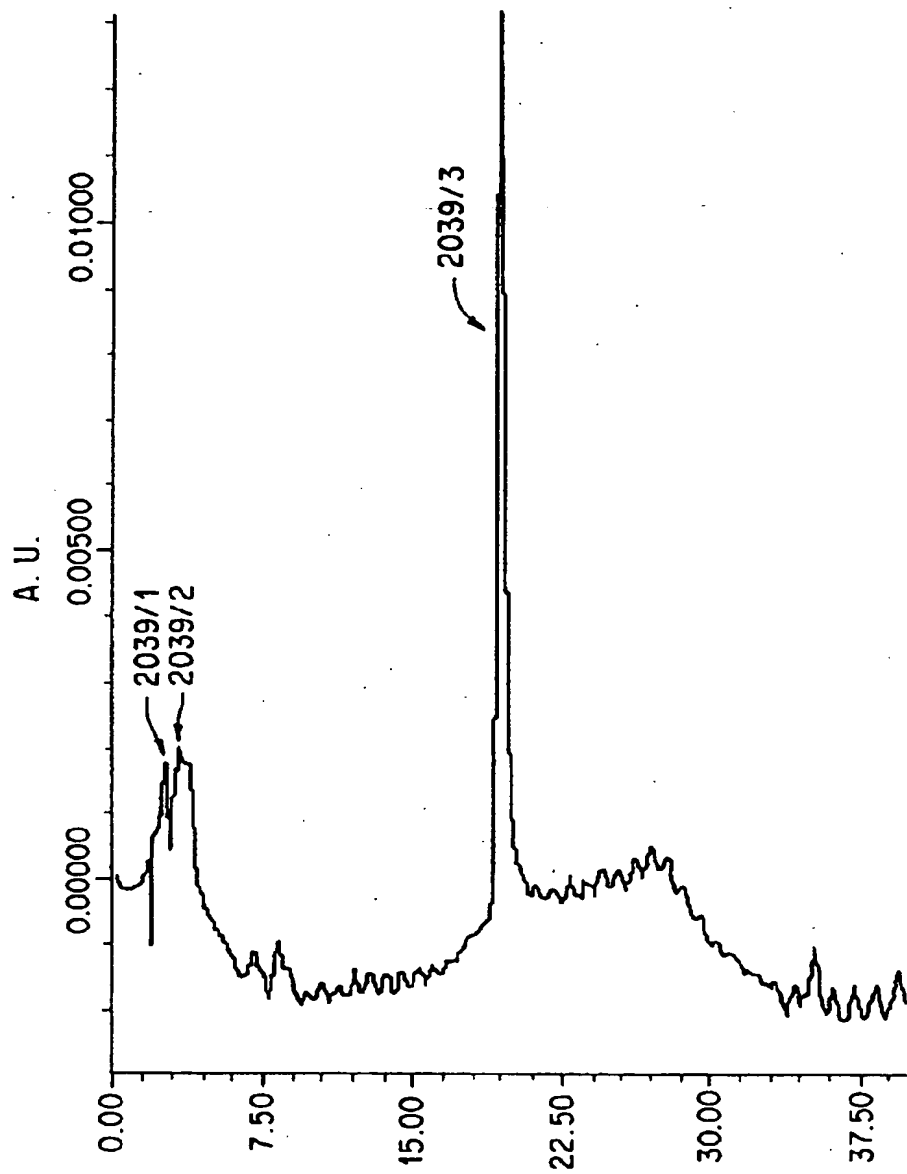
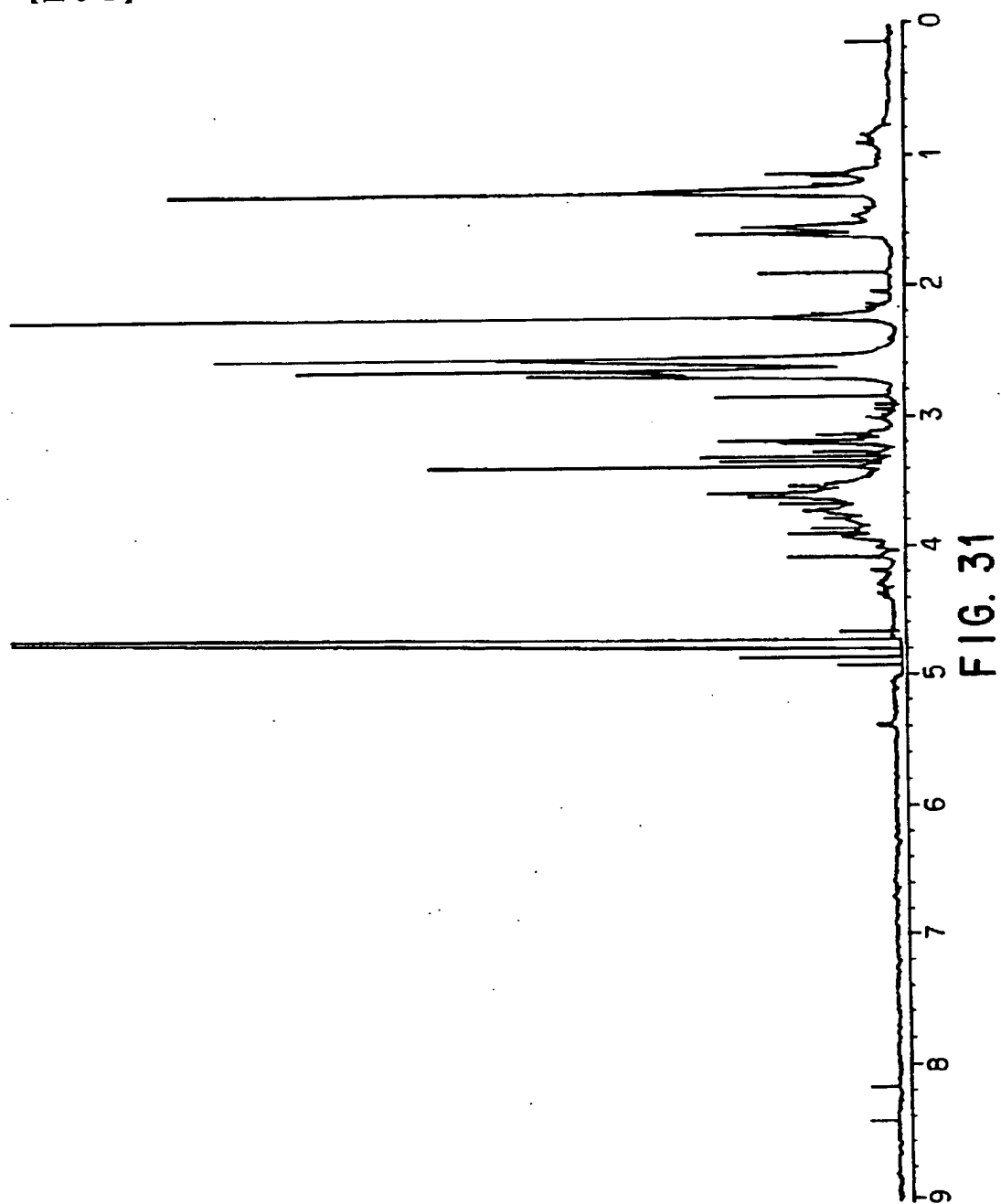


FIG. 30

【図 3 1】



【図 3 2】

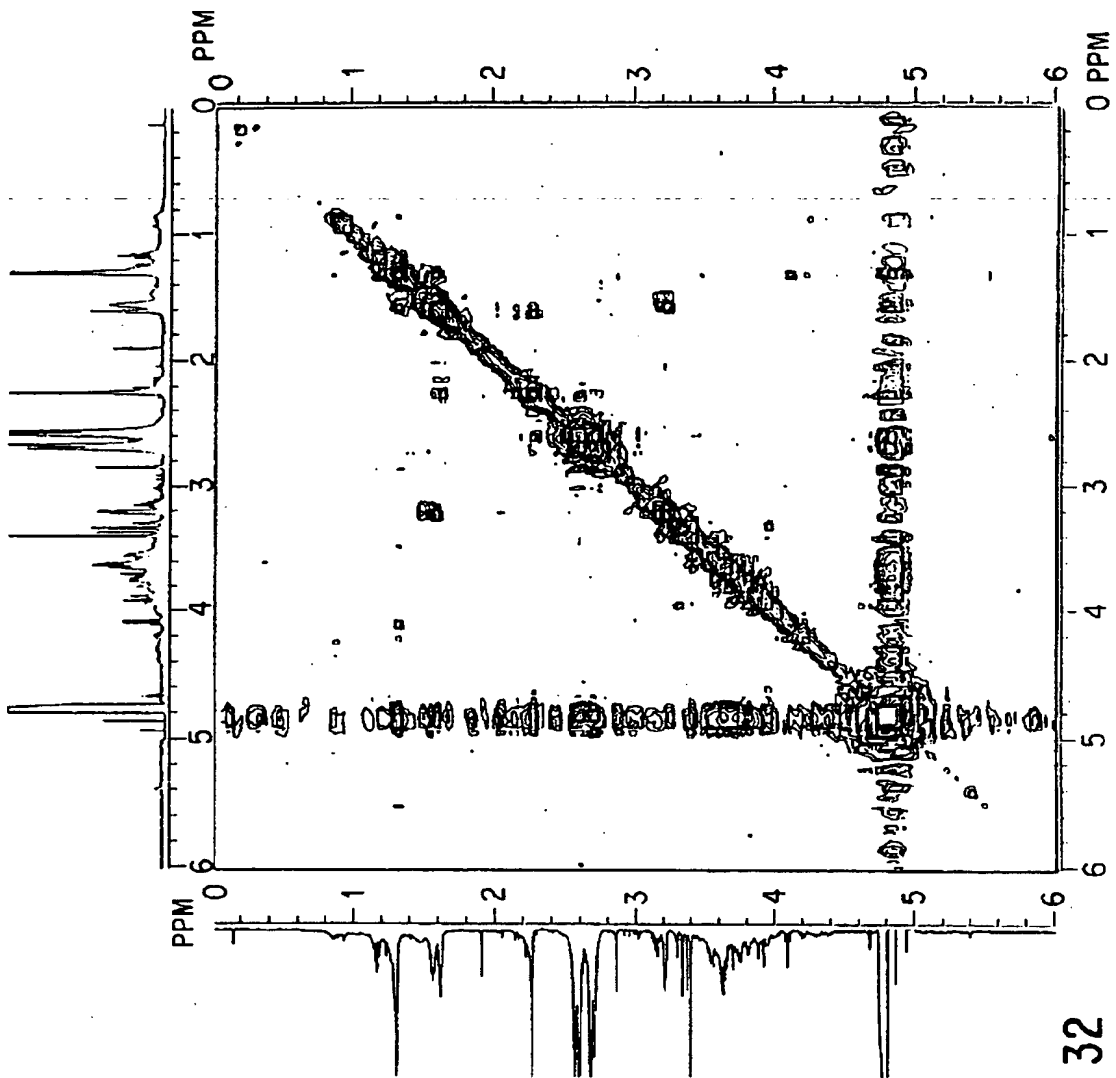


FIG. 32

【図 33】

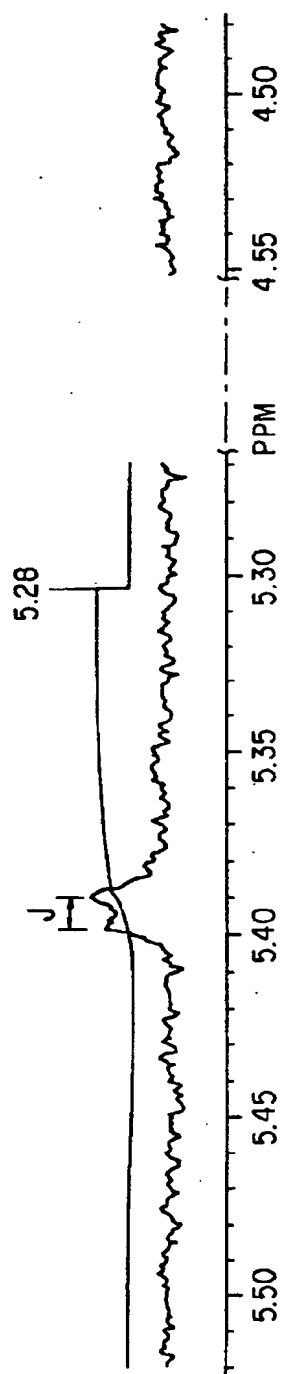


FIG. 33

【图 34】

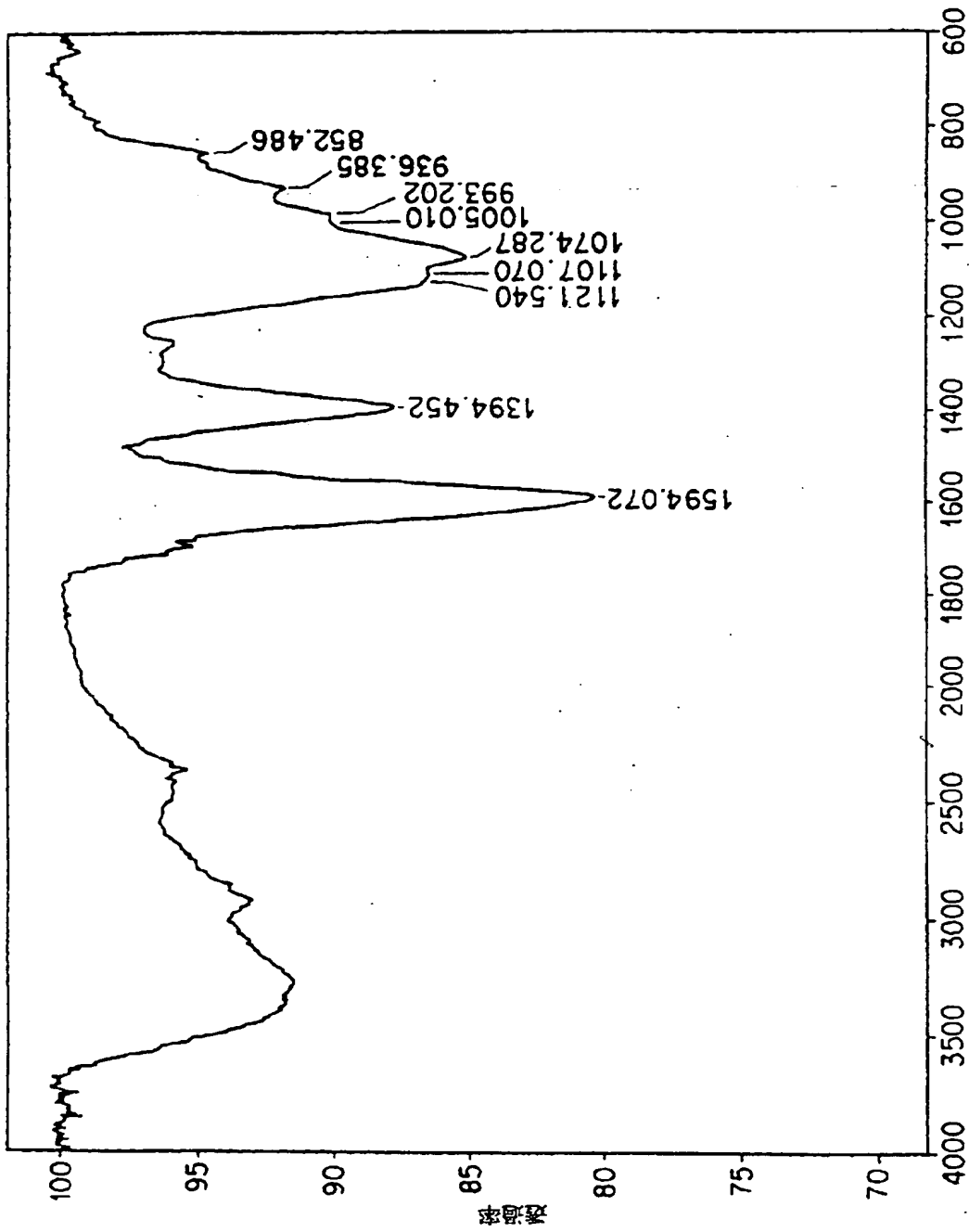
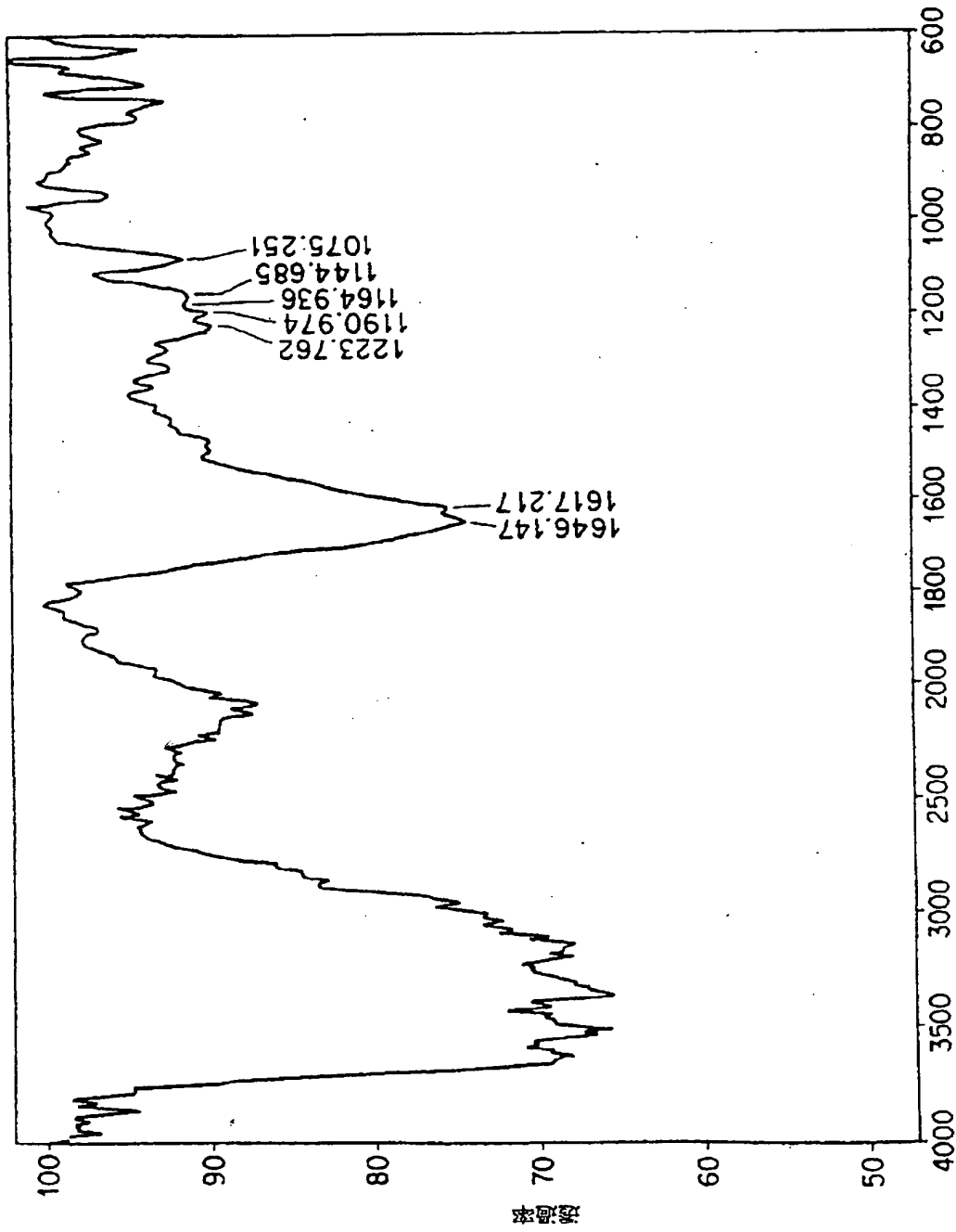


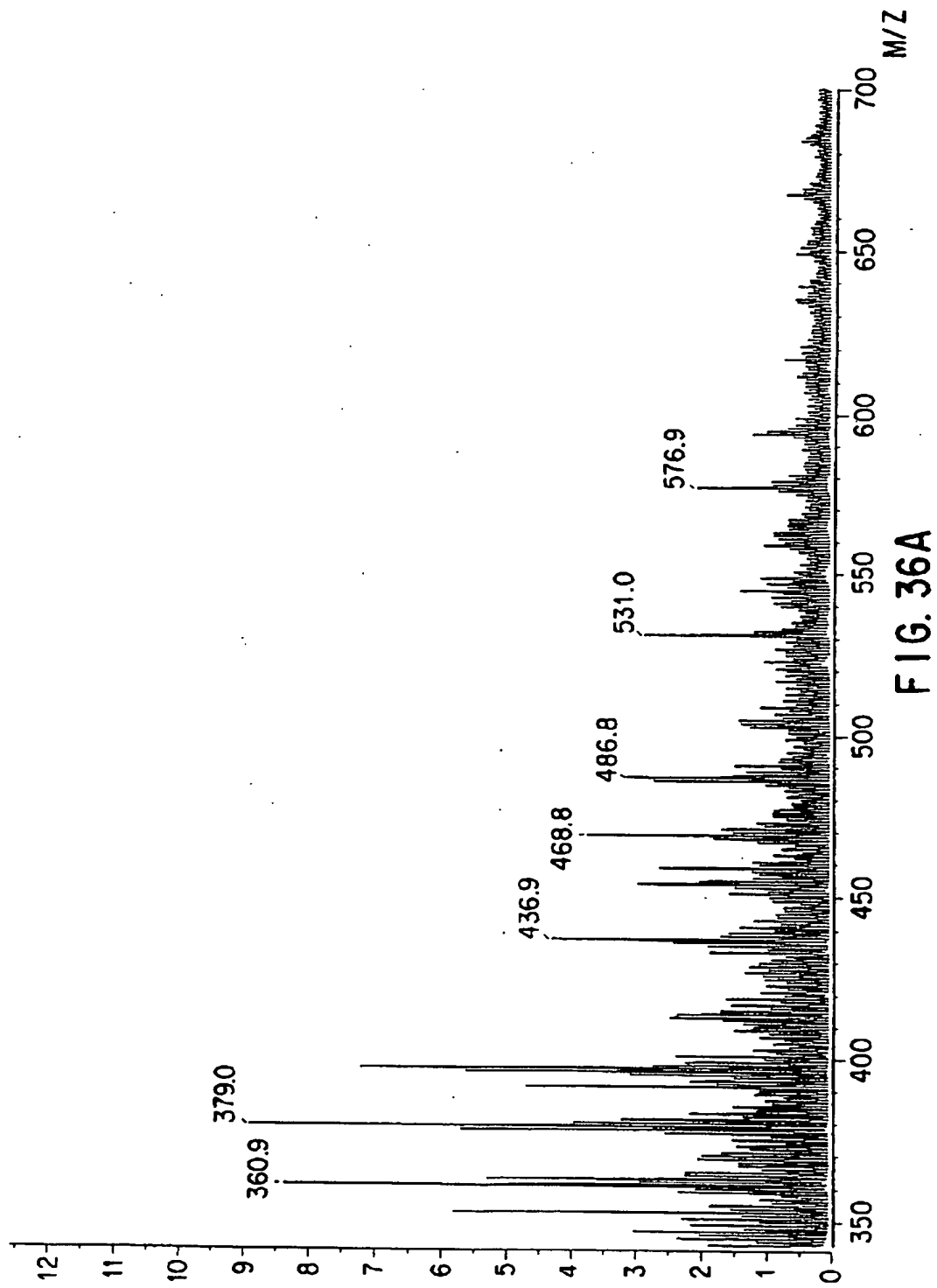
FIG. 34

【図35】



波数  
FIG. 35

【図 3 6 A】



【図 3 6 B】

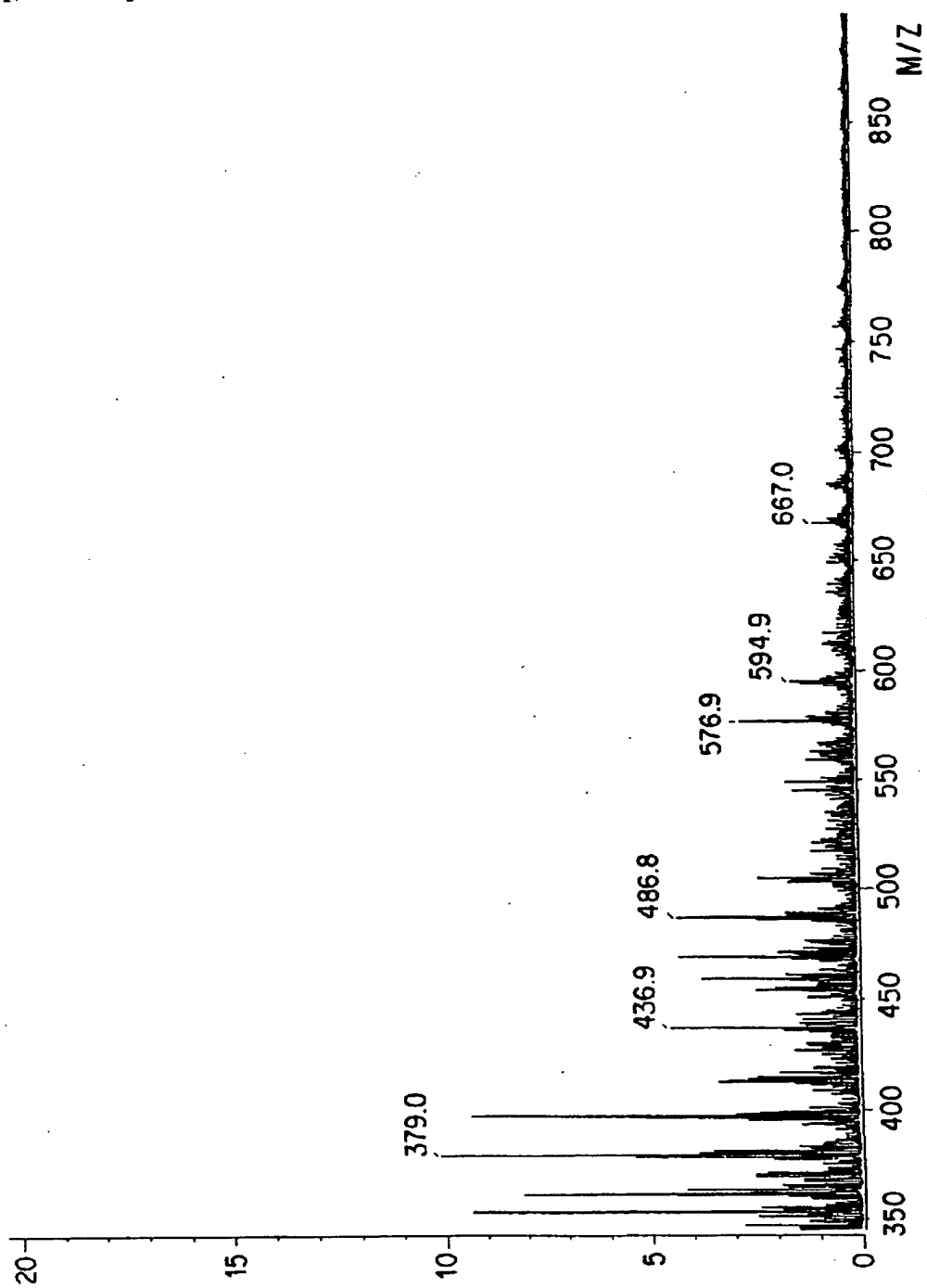


FIG. 36B



【図 3 7 A】

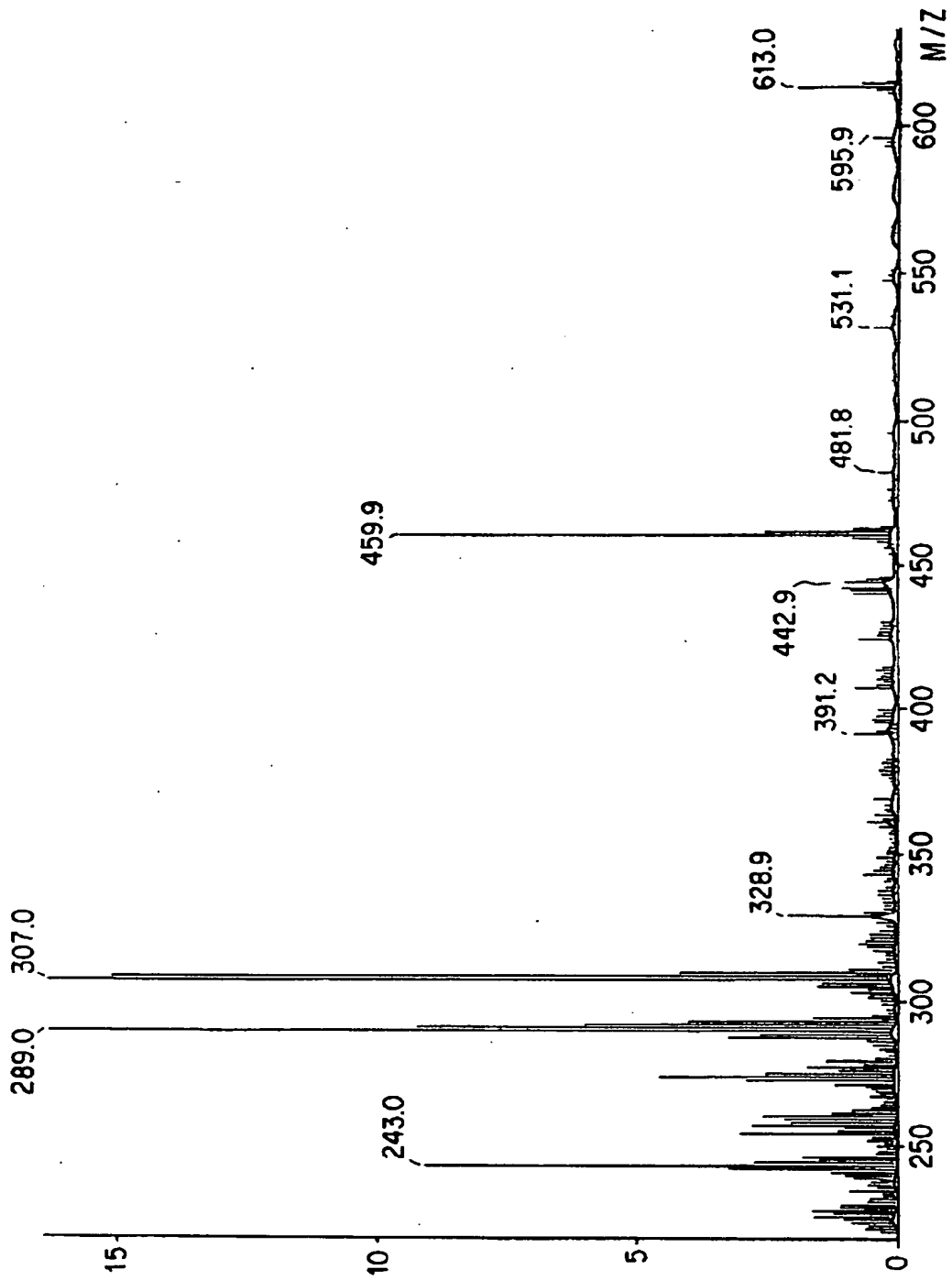


FIG. 37A

【図 37 B】

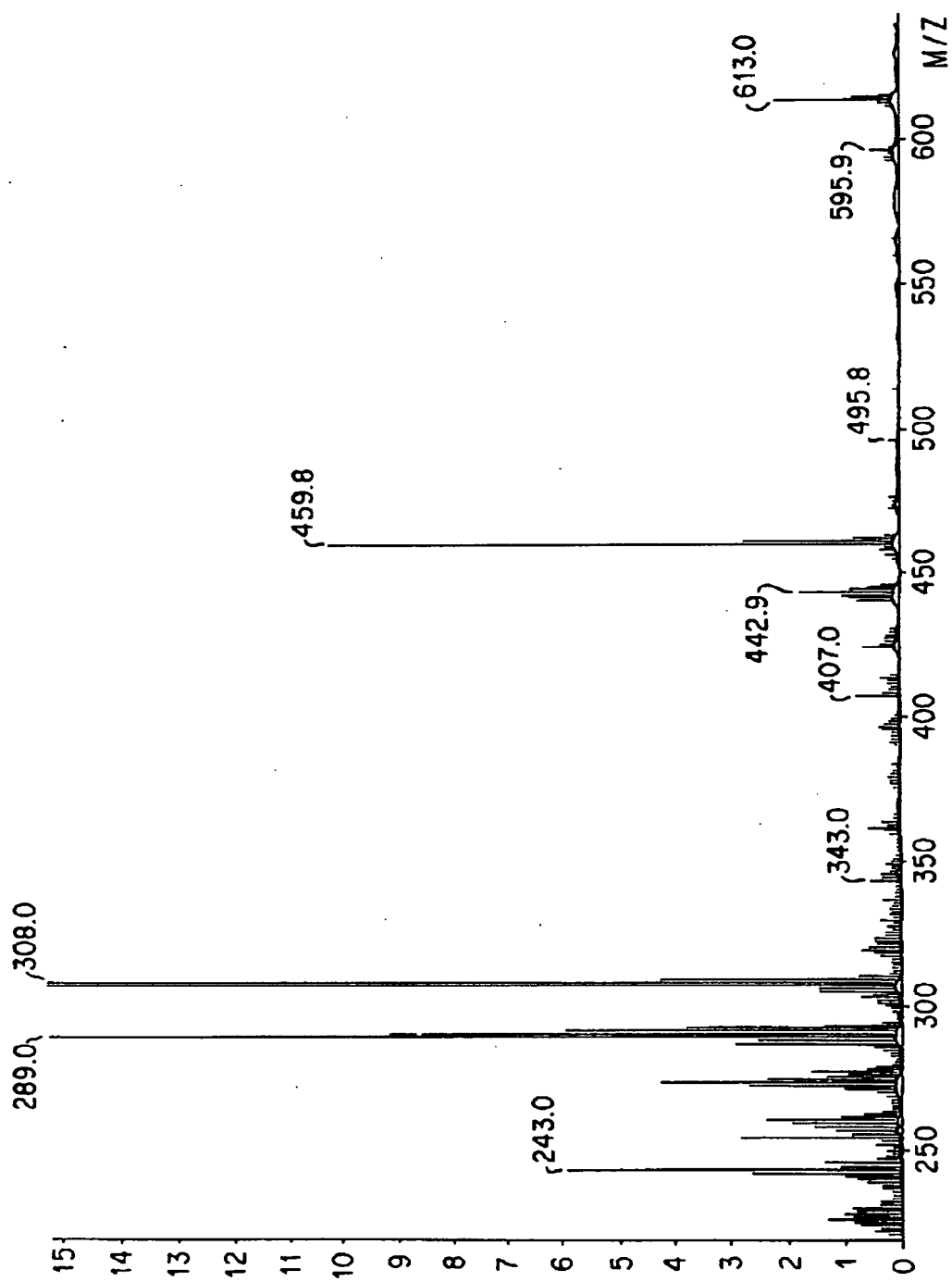


FIG. 37B

【図 3 8】

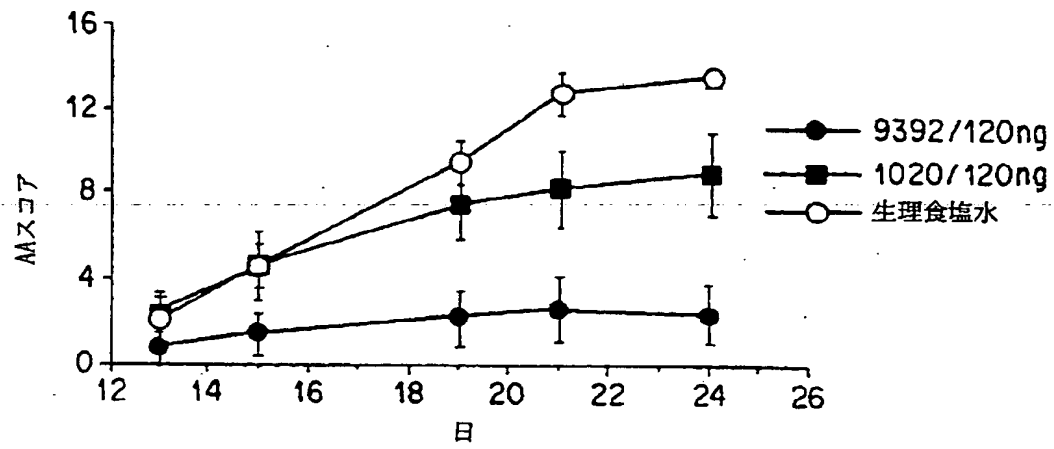


FIG. 38

【図 3 8 A】

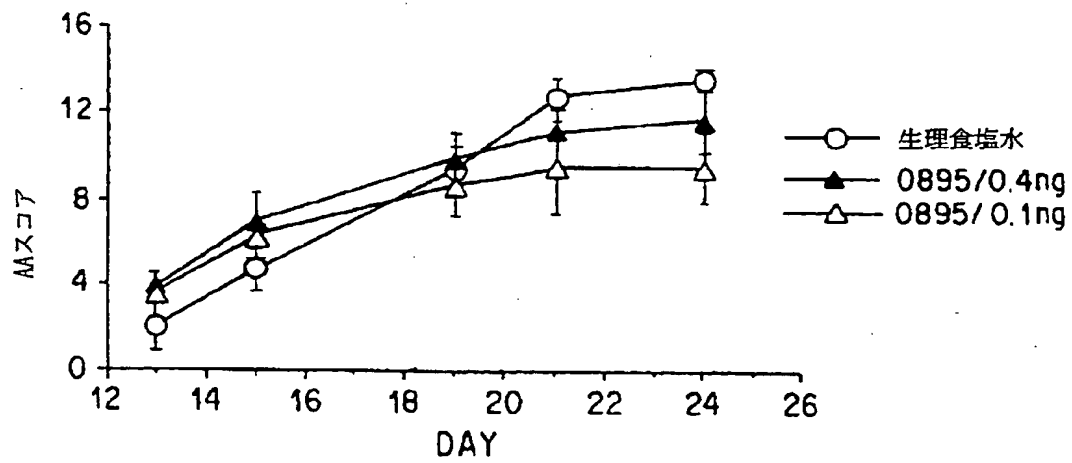


FIG. 38A

【図 38 B】

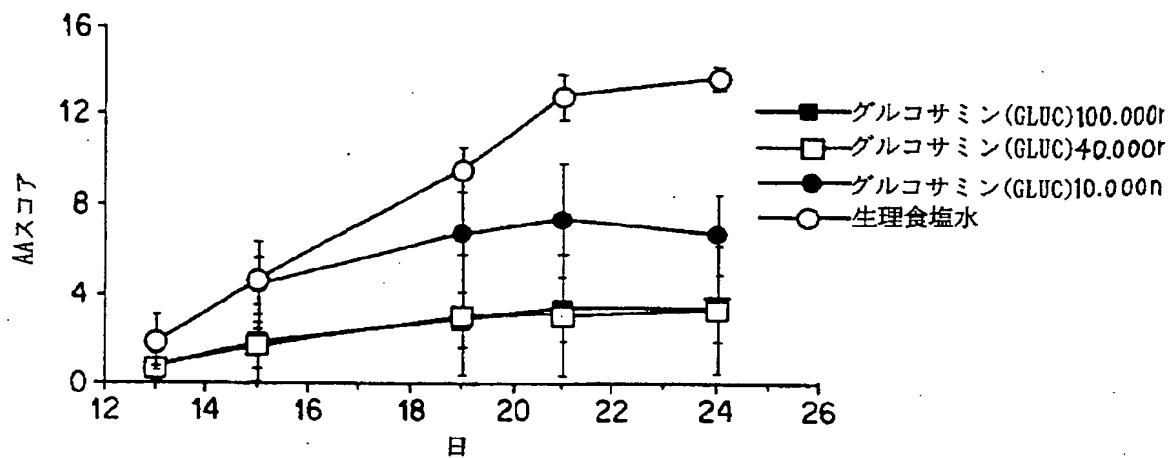


FIG. 38B

【図 38 C】

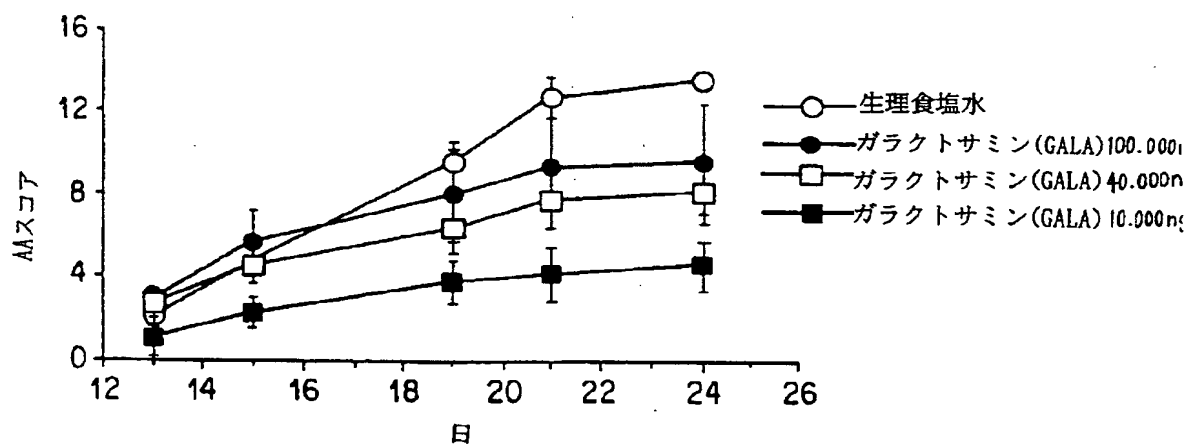


FIG. 38C

【図38D】

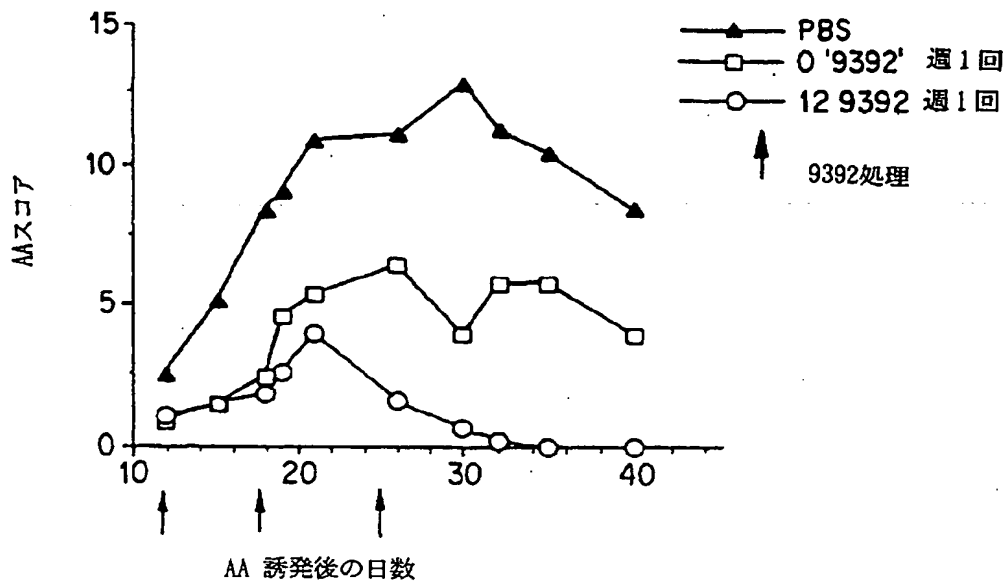


FIG. 38D

【図38E】

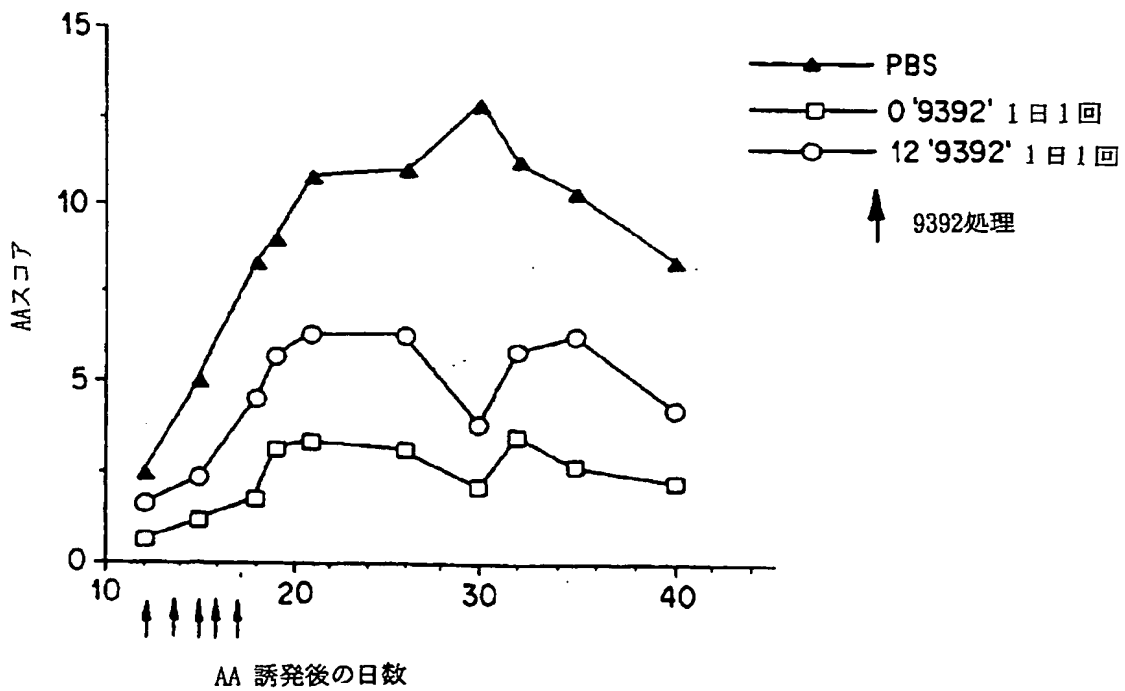


FIG. 38E

【図38F】

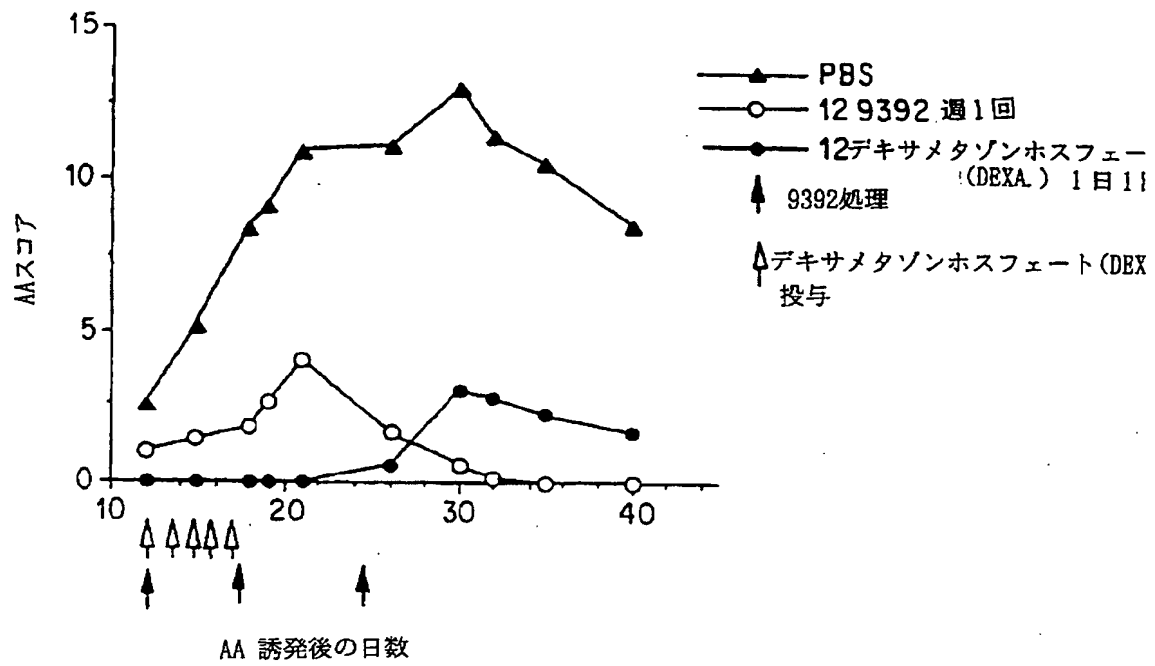


FIG. 38F

【図38G】

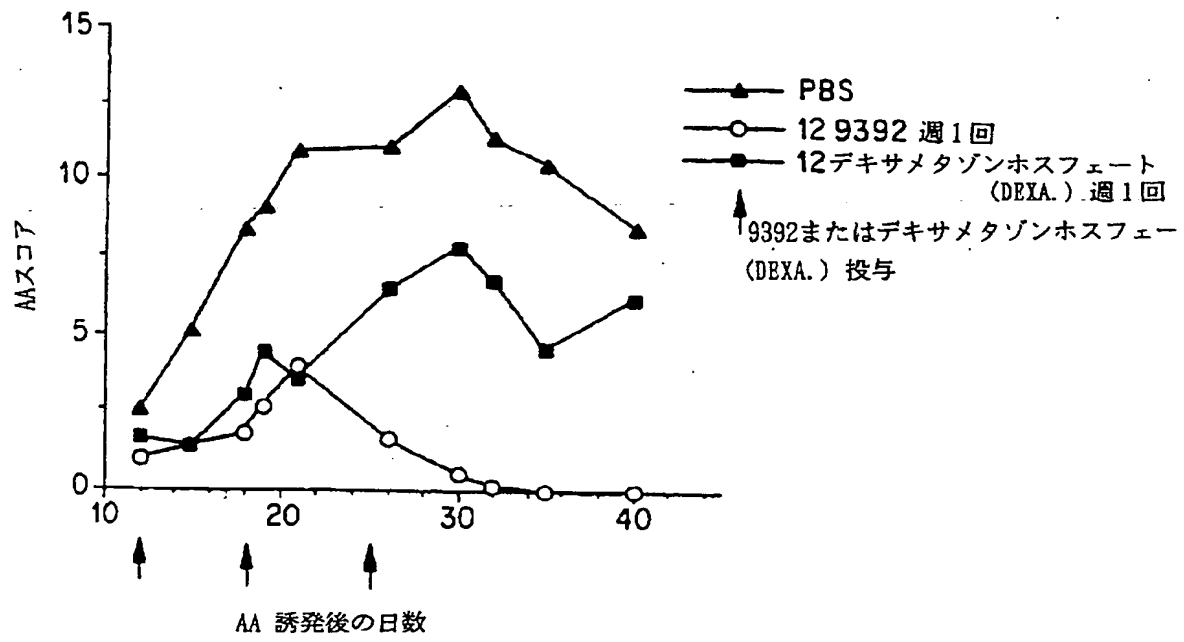


FIG. 38G

【図 39】

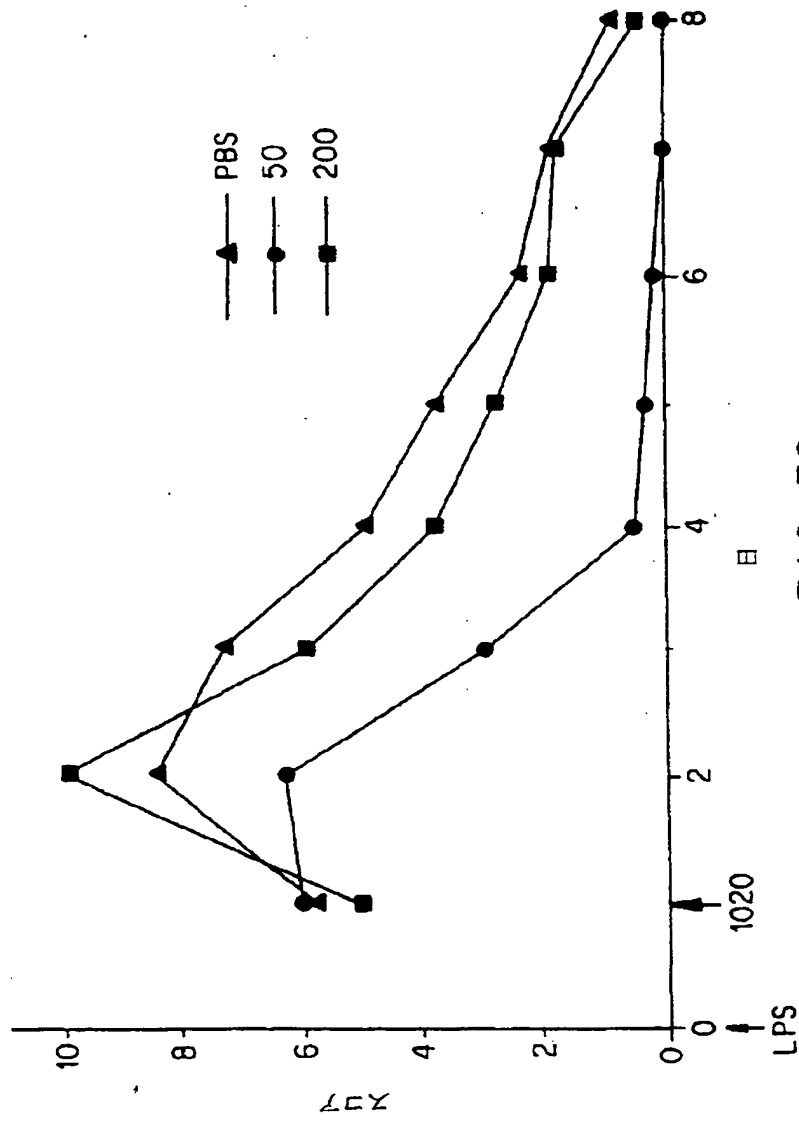


FIG. 39



【図39A】

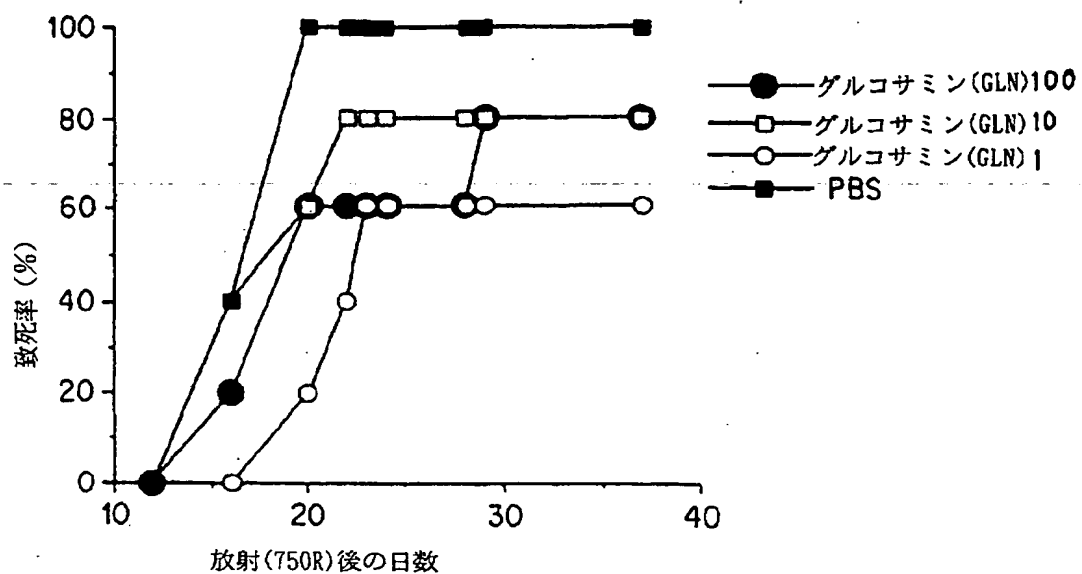


FIG. 39A

【図39B】

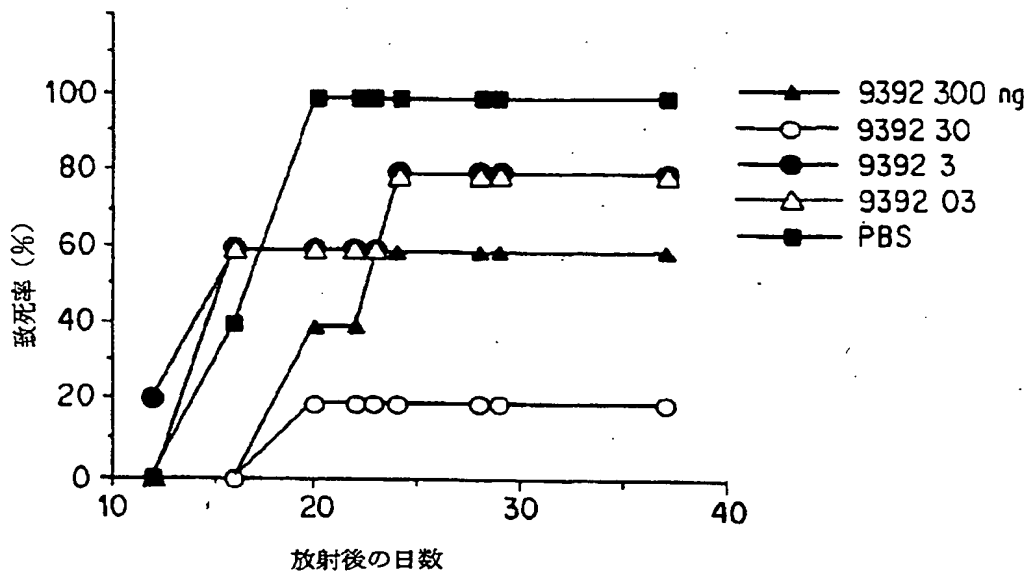


FIG. 39B

【図40】

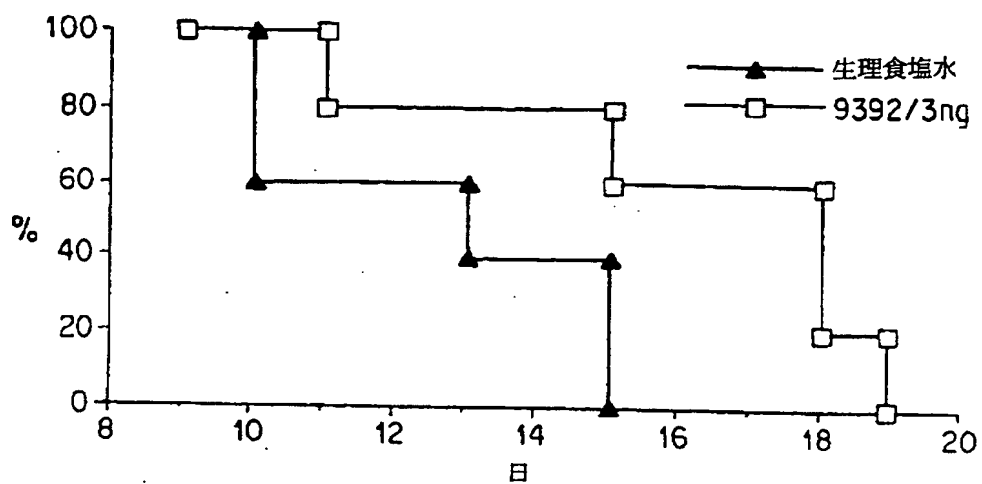


FIG. 40

【図40A】

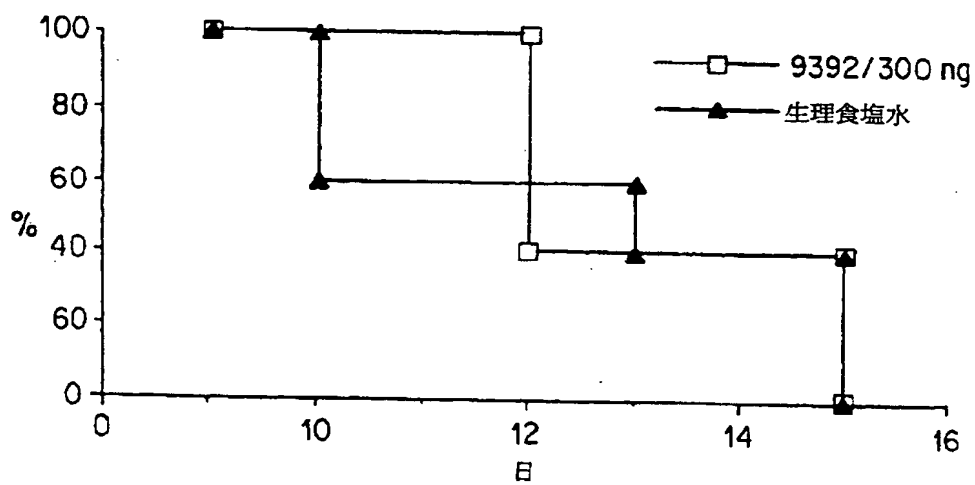


FIG. 40A

【図41】

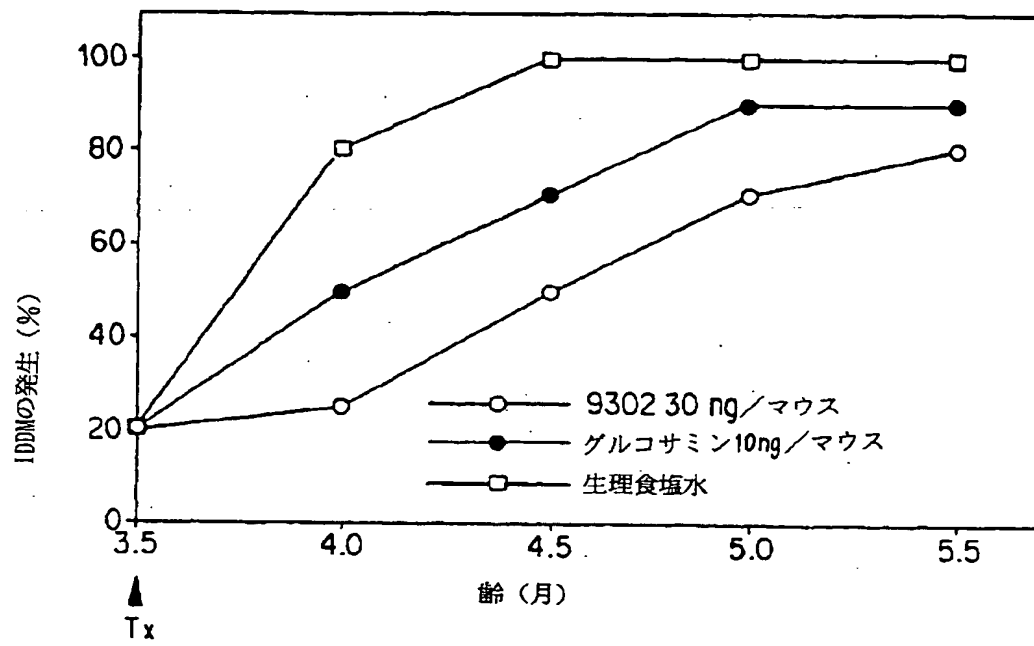


FIG. 41

【図41A】

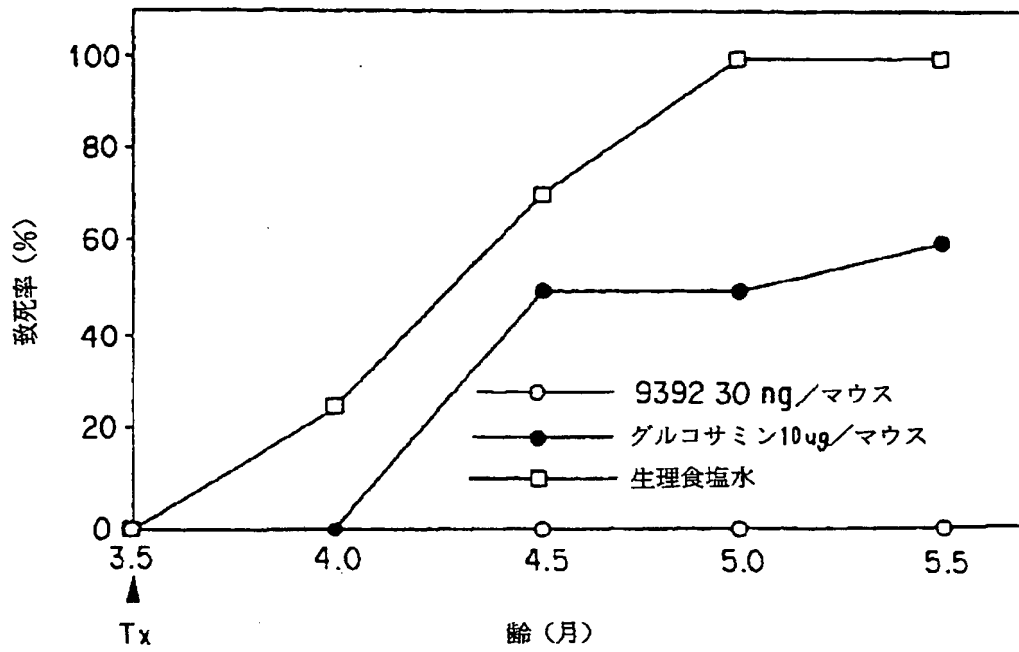


FIG. 41A

【図42】

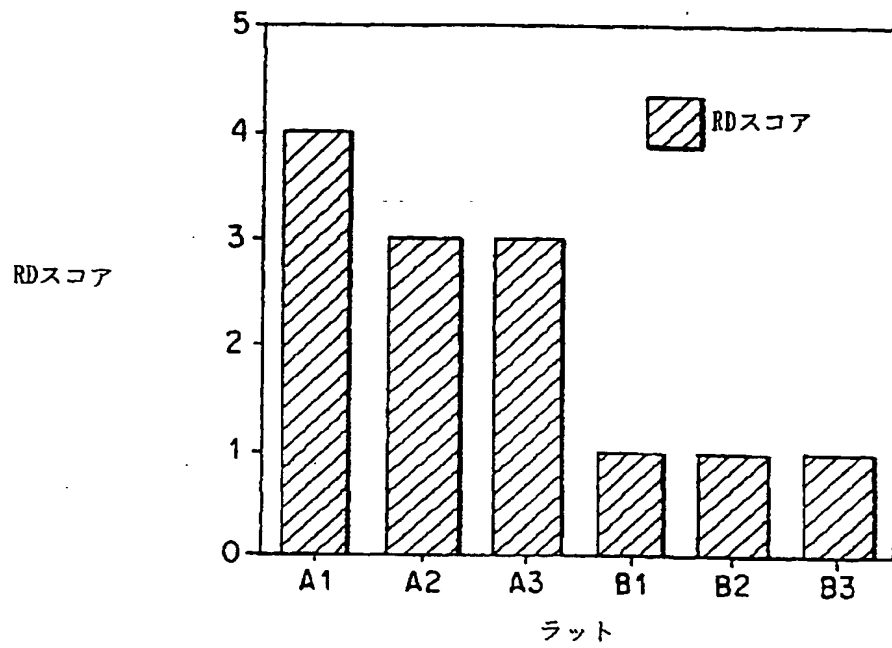


FIG. 42

【図43】

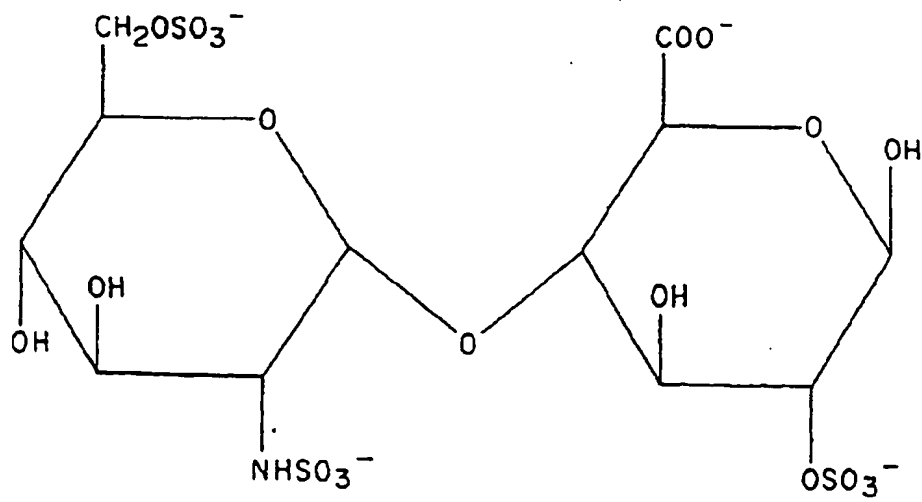


FIG. 43

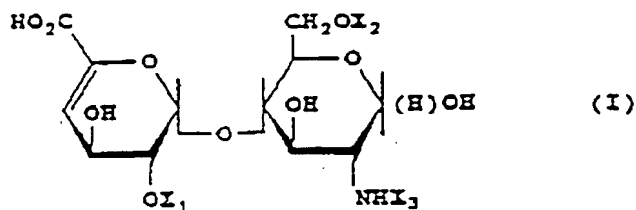
【手続補正書】特許法第184条の7第1項

【提出日】1994年4月6日

【補正内容】

請求の範囲

1. 式(I)



〔式中、 $X_1$ は水素または硫酸基であり、 $X_2$ は水素または硫酸基であり、そして $X_3$ は硫酸基またはアセチル基であるが、ただし、 $X_3$ が硫酸基であるときは、 $X_1$ または $X_2$ の少なくとも一方が硫酸基であり、そして $X_3$ がアセチル基であるときは、 $X_1$ と $X_2$ の両方が硫酸基である〕

で表される二糖またはその薬学的に許容される塩、および製剤学的に許容される担体を含む、活性TNF- $\alpha$ の産生を阻害するための医薬組成物。

2. 前記の二糖が2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェートグルコサミンである、請求項1に記載の医薬組成物。

3. 前記の二糖が4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェート-6-O-スルフェートグルコサミンである、請求項1に記載の医薬組成物。

4. 前記の二糖が2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スル

フェート-6-O-スルフェートグルコサミンである、請求項1に記載の医薬組成物。

5. 前記の二糖が2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-アセチル-6-O-スルフェートグ

ルコサミンである、請求項1に記載の医薬組成物。

6. 4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-アセチルグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩および製剤学的に許容される担体を含有する、活性TNF- $\alpha$ の産生を促進するための医薬組成物。

7. 非経口投与に適している、請求項1または6に記載の医薬組成物。

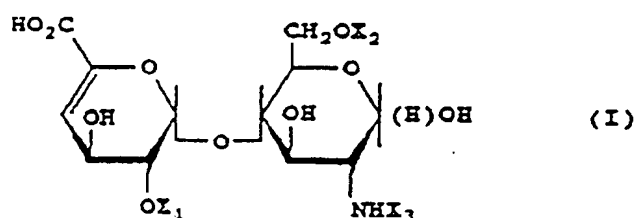
8. 経口投与に適している、請求項1または6に記載の医薬組成物。

9. 局所投与に適している、請求項1または6に記載の医薬組成物。

10. N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-イズロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩であって、N-硫酸化されている場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物、および製剤学的に許容される担体を含有する、活性TNF- $\alpha$ の産生を阻害するための医薬組成物。

11. 非硫酸化N-アセチル化4-デオキシ-4-エン-イズロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩および製剤学的に許容される担体を含有する、活性TNF- $\alpha$ の産生を促進するための医薬組成物。

12. 有効量の式(I)



[式中、 $X_1$ は水素または硫酸基であり、 $X_2$ は水素または硫酸基であり、そして $X_3$ は硫酸基またはアセチル基であるが、ただし、 $X_3$ が硫酸基であるときは、 $X_1$ または $X_2$ の少なくとも一方が硫酸基であり、そして $X_3$ がアセチル基であるときは、 $X_1$ と $X_2$ の両方が硫酸基である]

で表される二糖またはその薬学的に許容される塩を被験者に投与することを含む、被験者における活性サイトカインの産生を阻害する方法。

13. 有効量の4-デオキシ-4-エン-イズロン酸- $(\alpha-1, 4)$ -2-デオキシ-2-N-アセチルグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である二糖を被験者に投与することを含む、被験者における活性サイトカインの産生を促進する方法。

14. 前記の化合物またはその薬学的に許容される塩を毎日投与する、請求項12または13に記載の方法。

15. 前記の化合物またはその薬学的に許容される塩を週1回投与する、請求項12または13に記載の方法。

16. 前記の化合物またはその薬学的に許容される塩を非経口的、経口的または局所に投与する、請求項12または13に記載の方法。

17. 有効量の請求項10の医薬組成物を被験者に投与することを含む、

被験者における活性サイトカインの産生を阻害する方法。

18. 有効量の請求項11の医薬組成物を被験者に投与することを含む、被験者における活性サイトカインの産生を促進する方法。

19. TNF- $\alpha$ の不適當な産生によって引き起こされるか、またはTNF- $\alpha$ の不適當な産生に関連した医学的症状を予防または治療する医薬組成物を調製するための、N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-イズロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩であって、N-硫酸化されている場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物の使用方法。

20. TNF- $\alpha$ の産生増加に応答する医学的症状を治療する医薬組成物を調製するための、非硫酸化N-アセチル化4-デオキシ-4-エン-イズロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である化合物の使用方法。

21. N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-イズロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩であって、N-硫酸化されている場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物の有効量を被験者に投与することを含む、被験者における活性サイトカインの不適當な産生によって引き起こされる



か、または活性サイトカインの不適當な産生に関連した医学的症状を予防または治療する方法。

22. 非硫酸化N-アセチル化4-デオキシ-4-エン-イズロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩である化合物の有効

量を被験者に投与することを含む、被験者における活性サイトカインの産生増加に応答する医学的症状を治療する方法。

23. 前記の化合物が2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェートグルコサミンである、請求項19または21に記載の方法。

24. 前記の化合物が4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェート-6-O-スルフェートグルコサミンである、請求項19または21に記載の方法。

25. 前記の化合物が2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-スルフェート-6-O-スルフェートグルコサミンである、請求項19または21に記載の方法。

26. 前記の化合物が2-O-スルフェート-4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-アセチル-6-O-スルフェートグルコサミンである、請求項19または21に記載の方法。

27. 前記の化合物が4-デオキシ-4-エン-イズロン酸-( $\alpha$ -1, 4)-2-デオキシ-2-N-アセチルグルコサミンである、請求項20または22に記載の方法。

28. 前記の医学的症状が自己免疫疾患である、請求項19または21に記載の方法。

29. 前記の医学的症状がインシュリン依存性糖尿病、歯周病、炎症性腸疾患、皮膚病、ブドウ膜炎、リウマチ様疾患、慢性炎症、多発性硬化症、エリテマトーデス、アテローム硬化症、関節炎、脈管炎およびアレルギーより成る群から選ばれる、請求項19または

21に記載の方法。

30. 前記の医学的症状が新生物、ウイルス感染症、バクテリア感染症または真菌感染症である、請求項20または22に記載の方法。

31. 前記の医学的症状が基底皮膚癌、扁平上皮癌またはメラノーマである、請求項20または22に記載の方法。

32. 前記のサイトカインがIL-1、IL-6、IL-8またはTNF- $\alpha$ より成る群から選ばれる、請求項12、13、17、18、21または22に記載の方法。

33. N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-イブログルコサミンまたはその薬学的に許容される塩であって、N-硫酸化されている場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物の有効量を被験者に投与することを含む、被験者におけるインシュリン依存性糖尿病、菌周病、炎症性腸疾患、皮膚病、ブドウ膜炎、リウマチ様疾患、慢性炎症、多発性硬化症、エリテマトーデス、アテローム硬化症、関節炎、脈管炎およびアレルギーより成る群から選ばれる医学的症状を治療する方法。

34. N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-イブログルコサミンまたはその薬学的に許容される塩であって、N-硫酸化されている場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物、および製剤学的に許容される担体を含む、インシュリン依存性糖尿病、菌周病、炎症性腸疾患、皮膚病、ブドウ膜炎、リウマチ様疾患、慢性炎症、多発性硬化症、

エリテマトーデス、アテローム硬化症、関節炎、脈管炎およびアレルギーより成る群から選ばれる医学的症状を治療するための医薬組成物。

35. 単位投与形態をしている、請求項34に記載の医薬組成物。

36. N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-イブログルコサミンまたはその薬学的に許容される塩であって、N-硫酸化されている場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物の有効量を被験者に投与することを含む、被験者における同種異系移植片拒絶を抑制する方法。

37. 前記の同種異系移植が臓器移植である、請求項36に記載の方法。
38. 前記の臓器が心臓、肝臓、腎臓または骨髄である、請求項37に記載の方法。
39. 前記の同種異系移植が皮膚移植である、請求項36に記載の方法。
40. N-硫酸化またはN-アセチル化された4-デオキシ-4-エン-イズロノグルコサミンまたはその薬学的に許容される塩であって、N-硫酸化されている場合は少なくとも1つの他の硫酸基を有し、そしてN-アセチル化されている場合は少なくとも2つの硫酸基を有する化合物の有効量を被験者に投与することを含む、被験者における接着分子の発現を抑制する方法。
41. 前記の接着分子がICAM-1またはELAM-1である、請求項40に記載の方法。
42. 培地中でヒトCD<sup>+</sup>T細胞を様々な濃度の被験物質と共にブレインキューベートし、被験物質の不在下でT細胞によるTNF- $\alpha$ の分泌を引き出すのに効果的な活性化剤を一定量加え、十分な時

間の後で培地を回収し、その後培地中のTNF- $\alpha$ の活性を試験することを含む、活性TNF- $\alpha$ の分泌に与える被験物質の効果を定量化するためのin vitroバイオアッセイ。

43. 被験者におけるサイトカイン活性を阻害または促進するのに有効な量の物質および製剤学的に許容される担体を含有する被験者におけるサイトカイン活性を調節するための医薬組成物であって、該物質はカルボキシル化および／または硫酸化オリゴ糖またはその薬学的に許容される塩から成り、かつ、0～約2  $\mu$ g/g（マウス）の範囲の様々な投与量の該物質で処理したマウスの相対的実験DTH反応を測定するin vivoバイオアッセイで測定したとき、ゼロ以外の“R”値を示すものである、上記の医薬組成物。
44. 前記の物質が被験者におけるサイトカイン活性を阻害するのに効果的で、ゼロ以外の阻害“R”値を示すものである、請求項43に記載の医薬組成物。
45. 前記の物質が被験者におけるサイトカイン活性を促進するのに効果的で、ゼロ以外の促進“R”値を示すものである、請求項43に記載の医薬組成物。
46. 前記のオリゴ糖が二糖である、請求項43、44または45に記載の医薬組成物。

47. 前記のオリゴ糖がカルボキシル化されている二糖である、請求項43、44または45に記載の医薬組成物。

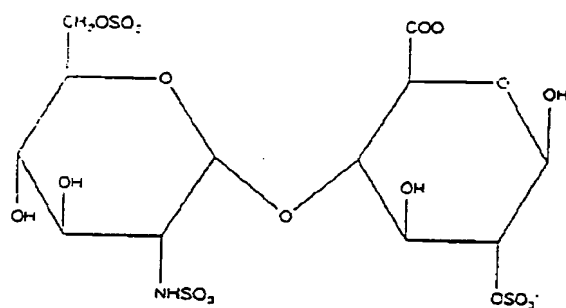
48. 前記のオリゴ糖がカルボキシル化および硫酸化されている二糖である、請求項43または44に記載の医薬組成物。

49. 前記のオリゴ糖がカルボキシル化されているが、硫酸化されていない二糖である、請求項45に記載の医薬組成物。

50. 前記のサイトカインがIL-1、IL-6、IL-8およびTNF- $\alpha$ より成る群から選ばれる、請求項43、44または45に記載の医薬組成物。

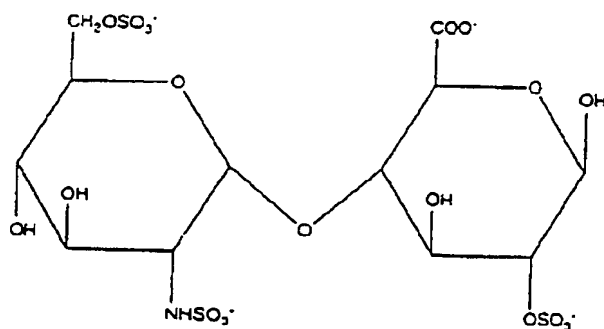
51. 前記のサイトカインがTNF- $\alpha$ である、請求項46に記載の医薬組成物。

52. 式IIの化合物



またはその薬学的に許容される塩。

53. 式IIの二糖



またはその薬学的に許容される塩を含有する、活性TNF- $\alpha$ の産生を阻害するための医薬組成物。

54. 有効量の請求項52の化合物を被験者に投与することを含む、被験者における

活性サイトカインの産生を阻害する方法。

55.  $\text{TNF-}\alpha$  の不適当な産生によって引き起こされるか、または

$\text{TNF-}\alpha$  の不適当な産生に関連した医学的症状を予防または治療する医薬組成物を調製するための、請求項52の化合物である化合物の使用方法。

56.  $\text{TNF-}\alpha$  の阻害された産生に応答する医学的症状を治療する医薬組成物を調製するための、請求項52の化合物である化合物の使用方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US93/10868

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(5) : A61K 31/725; C08B 37/10

US CL : 514/56, 56.54; 536/21, 55.3, 124

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 514/56, 56.54; 536/21, 55.3, 124

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 4,401,662 (Lormeau et al.) 30 August 1983, See entire document.	1-56
Y	US, A, 4,727,063 (Naggi et al.) 23 February 1988, See entire document.	1-56
Y	US, A, 4,818,816 (Petitou et al.) 04 April 1989, See entire document.	1-56
Y	US, A, 4,933,326 (Blanchini et al.) 12 June 1990, See entire document.	1-56
Y	US, A, 4,990,502 (Lormeau et al.) 05 February 1991, See entire document.	1-56

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	* T	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention
* A		document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance
* E		earlier document published on or after the international filing date
* L	* X	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
* O	* Y	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
* P	* A	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
		document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 January 1994

Date of mailing of the international search report

FEB 08 1994

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Authorized officer

ANITA VARMA

Facsimile No. NOT APPLICABLE

Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US93/10868

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 5,034,520 (Lormeau et al.) 23 July 1991, See entire document.	1-56

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>°</sup>	識別記号	弁内整理番号	F I
A 61 K 31/70	ACK ADP ADU ADY		
C 07 H 5/06		8615-4C	
11/00		8615-4C	
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG , CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, BY, CA, CZ, FI, HU, JP, KR, KZ, LK, LV, M G, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD , SK, UA, US, US, UZ, VN		
(71)出願人	カハロン, リオラ イスラエル国 ギバタイム, シルキン ス トリート 31番地		
(71)出願人	ショセヨヴ, オデッド イスラエル国 72910 シムション, カル メ ヨセフ ディー, エヌ, ビー, オー, ボックス 6098 ヘーレッツ ストリート 5番地		
(71)出願人	マルガリット, ラーナン イスラエル国 76503 レホヴォット, ゼ ラク ショービ ストリート 7番地		
(72)発明者	コーヘン, イルン アール, イスラエル国 76100 レホヴォット ハ ンキン ストリート 11番地		
(72)発明者	リダー, オファー イスラエル国 76100 レホヴォット, ゴ ードン ストリート 21番地		
(72)発明者	カハロン, リオラ イスラエル国 ギバタイム, シルキン ス トリート 31番地		
(72)発明者	ショセヨヴ, オデッド イスラエル国 72910 シムション, カル メ ヨセフ ディー, エヌ, ビー, オー, ボックス 6098 ヘーレッツ ストリート 5番地		
(72)発明者	マルガリット, ラーナン イスラエル国 76503 レホヴォット, ゼ ラク ショービ ストリート 7番地		



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**